Robert K. Murray
David A. Bender
Kathleen M. Botham
Peter J. Kennelly
Victor W. Rodwell
P. Anthony Weil

booksmedicos.org

BIOQUÍMICA ILUSTRADA DE HARPER

29ª Edição

Mc Graw Hill Education

artmed

LANGE™

Equipe de tradução

José Eduardo Ferreira de Figueiredo
Patricia Lydie Voeux
Luís Fernando Marques Dorvillé

Revisão técnica desta edição

Guilhian Leipnitz
Professor adjunto do Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica, pela UFRGS.

B615 Bioquímica ilustrada de Harper [recurso eletrônico] / Robert K. Murray ... [et al.] ; [tradução: José Eduardo Ferreira de Figueiredo, Patricia Lydie Voeux, Luís Fernando Marques Dorvillé ; revisão técnica: Guilhian Leipnitz]. – 29. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre : AMGH, 2014.

Editado também como livro impresso em 2014.
ISBN 978-85-8055-281-2

1. Bioquímica. 2. Murray, Robert K.

CDU 577.1

Catalogação na publicação: Ana Paula M. Magnus – CRB 10/2052

Um livro médico LANGE

Robert K. Murray, M.D., Ph.D.
Emeritus Professor of Biochemistry
University of Toronto
Toronto, Ontario

Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc.
Professor of Biochemistry
Department of Veterinary Basic Sciences
Royal Veterinary College
University of London
London, United Kingdom

Victor W. Rodwell, Ph.D.
Professor (Emeritus) of Biochemistry
Purdue University
West Lafayette, Indiana

David A. Bender, Ph.D.
Professor (Emeritus) of Nutritional Biochemistry
University College London
London, United Kingdom

Peter J. Kennelly, Ph.D.
Professor and Head
Department of Biochemistry
Virginia Polytechnic Institute and State University
Blacksburg, Virginia

P. Anthony Weil, Ph.D.
Professor of Molecular Physiology and Biophysics
Vanderbilt University School of Medicine
Nashville, Tennessee

BIOQUÍMICA ILUSTRADA DE HARPER

29ª Edição

Versão impressa
desta obra: 2014

Mc Graw Hill Education

artmed

AMGH Editora Ltda.

2014

Obra originalmente publicada sob o título *Harper's illustrated biochemistry*, 29th edition
ISBN 007176576X / 9780071765763

Original edition copyright ©2012, The McGraw-Hill Global Education Holdings, LLC., New York, New York 10020. All rights reserved.

Portuguese language translation copyright ©2014, AMGH Editora Ltda., a Grupo A Educação S.A. company. All rights reserved.

Gerente editorial: *Letícia Bispo de Lima*

Colaboraram nesta edição:

Editora: *Simone de Fraga*

Arte sobre capa original: *VS Digital Ltda.*

Preparação de originais: *Carine Garcia Prates*

Leitura final: *Henrique de Oliveira Guerra*

Editoração: *Techbooks*

Nota

A medicina é uma ciência em constante evolução. À medida que novas pesquisas e a experiência clínica ampliam o nosso conhecimento, são necessárias modificações no tratamento e na farmacoterapia. Os organizadores desta obra consultaram as fontes consideradas confiáveis, num esforço para oferecer informações completas e, geralmente, de acordo com os padrões aceitos à época da publicação. Entretanto, tendo em vista a possibilidade de falha humana ou de alterações nas ciências médicas, os leitores devem confirmar estas informações com outras fontes. Por exemplo, e em particular, os leitores são aconselhados a conferir a bula de qualquer medicamento que pretendam administrar, para se certificar de que a informação contida neste livro está correta e de que não houve alteração na dose recomendada nem nas contraindicações para o seu uso. Esta recomendação é particularmente importante em relação a medicamentos novos ou raramente usados.

Reservados todos os direitos de publicação, em língua portuguesa, à
AMGH EDITORA LTDA., uma parceria entre GRUPO A EDUCAÇÃO S.A. e McGRAW-HILL EDUCATION
Av. Jerônimo de Ornelas, 670 – Santana
90040-340 – Porto Alegre – RS
Fone: (51) 3027-7000 Fax: (51) 3027-7070

É proibida a duplicação ou reprodução deste volume, no todo ou em parte, sob quaisquer formas ou por quaisquer meios (eletrônico, mecânico, gravação, fotocópia, distribuição na Web e outros), sem permissão expressa da Editora.

Unidade São Paulo
Av. Embaixador Macedo Soares, 10.735 – Pavilhão 5 – Cond. Espace Center
Vila Anastácio – 05095-035 – São Paulo – SP
Fone: (11) 3665-1100 Fax: (11) 3667-1333

SAC 0800 703-3444 – www.grupoa.com.br

Coautores

Daryl K. Granner, M.D.

Professor (Emeritus) of Molecular Physiology
and Biophysics and Medicine
Vanderbilt University
Nashville, Tennessee

Frederick W. Keeley, Ph.D.

Associate Director and Senior Scientist
Research Institute, Hospital for Sick Children,
Toronto, and Professor of Biochemistry
Department of Biochemistry
University of Toronto
Toronto, Ontario

Joe Varghese, M.B. B.S., M.D.

Assistant Professor
Department of Biochemistry
Christian Medical College
Vellore, Tamil Nadu

Margaret L. Rand, Ph.D.

Associate Senior Scientist
Hospital for Sick Children,
Toronto, and Professor,
Departments of Laboratory
Medicine & Pathobiology and Biochemistry
University of Toronto
Toronto, Ontario

Molly Jacob, M.B. B.S., M.D., Ph.D.

Professor and Chair
Department of Biochemistry
Christian Medical College
Vellore, Tamil Nadu

Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

Emeritus Professor of Veterinary Biochemistry
Royal Veterinary College
University of London
London, United Kingdom

Peter L. Gross, M.D., M.Sc., FRCP(C)

Associate Professor
Department of Medicine
McMaster University
Hamilton, Ontario

Prefácio

Temos o prazer de apresentar a 29ª edição do *Bioquímica ilustrada de Harper*. A 1ª edição deste livro, intitulada *Bioquímica de Harper*, foi publicada em 1939 sob a autoria única do Dr. Harold Harper, da Universidade da Califórnia, em São Francisco. À medida que novas edições foram publicadas, vários autores trouxeram sua contribuição.

A ilustração da capa desta edição

A ilustração da capa desta edição celebra Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider e Jack W. Szostak, que dividiram o Prêmio Nobel de 2009 em Fisiologia ou Medicina por seu trabalho inspirador sobre telômeros e a enzima telomerase. Os telômeros compreendem até 200 cópias de uma sequência de DNA repetitiva chamada de G-quadrúplice, estrutura nomeada a partir do seu arranjo cíclico único de quatro conjuntos de quatro bases guanina ligadas por pontes de hidrogênio em um arranjo cabeça-cauda que estabiliza essa estrutura. Na ilustração, o esqueleto de fosfodiéster do DNA é representado por uma fita, e as bases guanina, pelos hexágonos preenchidos fusionados aos pentágonos preenchidos. A gradação de cores do espectro de roxo a vermelho facilita o acompanhamento da progressão da cadeia de polinucleotídeos. Os quatro conjuntos de unidades tetra-guanina cíclicas podem ser vistos no centro, empilhados de cima para abaixo e inclinados em aproximadamente 45º da esquerda para a direita. (Adaptada do Banco de Dados de Proteínas ID nº 2KKA.)

Como consequência da natureza unidirecional da replicação do DNA, cada vez que um cromossomo é replicado, o número de unidades G-quadrúplice diminui. Quando o suprimento de unidades de telômeros é completamente exaurido, a replicação cessa e a célula entra em transição para um estado senescente. Os cientistas especulam que o telômero serve como um relógio de contagem regressiva que limita o número de vezes que uma célula somática pode se dividir e, assim, seu tempo de vida.

Mudanças nesta edição

Coerentes com nosso objetivo de oferecer aos estudantes um livro que descreva e ilustre a bioquímica de uma maneira medicamente relevante, atualizada, abrangente e ainda assim relativamente concisa, além de atualizar cada capítulo, novos conteúdos importantes aparecem nesta edição.

Cada capítulo inicia com uma breve descrição de seus objetivos, seguida de um registro sucinto da sua importância bioquímica. Foram adicionadas mais de 250 questões de múltipla escolha com banco de respostas.

Inclusão de três capítulos inteiramente novos:

"A Bioquímica do Envelhecimento"
"Câncer: Considerações Gerais"
"Bioquímica Clínica"

Mudanças adicionais importantes:

- Inclusão de aspectos de epidemiologia no capítulo sobre "Bioinformática e Biologia Computacional".
- Novas figuras que ilustram abordagens essenciais para identificar possíveis sítios ativos, locais de ligação de ligantes e outros sítios de interação (Seção I) e vários aspectos do metabolismo (Seção II).
- Novas tabelas que resumem aspectos das doenças metabólicas, incluindo aquelas do metabolismo das purinas, das pirimidinas e dos aminoácidos (Seção III).
- Discussão ampliada sobre RNAs não codificadores, reparo de danos de DNA e doenças humanas, fatores epigenéticos que controlam a expressão gênica de eucariotos, atividades de miRNAs e novos ensaios poderosos para monitorar e caracterizar a transcrição pangenômica (Seção IV).
- Novas tabelas que abordam as necessidades de vitaminas e sais minerais e uma ampla discussão do metabolismo do ferro na saúde e na doença (Seção VI).

Organização do livro

Após dois capítulos introdutórios, o livro foi dividido em seis seções principais. Todas as seções e todos os capítulos enfatizam a relevância médica da bioquímica.

A **Seção I** aborda as estruturas e as funções das proteínas e enzimas. Esta seção também contém um capítulo sobre Bioinformática e Biologia Computacional, refletindo a crescente importância desses tópicos na bioquímica moderna, biologia e medicina.

A **Seção II** explica como várias reações celulares consomem ou liberam energia e acompanha as vias pelas quais os carboidratos e lipídeos são sintetizados e degradados. São também descritas as várias funções dessas moléculas.

A **Seção III** discorre sobre os aminoácidos, seus destinos metabólicos, certas características do catabolismo de proteínas e a bioquímica das porfirinas e dos pigmentos da bile.

A **Seção IV** descreve a estrutura e a função dos nucleotídeos e ácidos nucleicos, a replicação e o reparo de DNA, a síntese de RNA e modificação, a síntese proteica, os princípios da tecnologia do DNA recombinante e a nova compreensão de como a expressão gênica é regulada.

A **Seção V** aborda os aspectos da comunicação extracelular e intracelular. Tópicos incluem a estrutura e a função da membrana, as bases moleculares das ações dos hormônios e o campo da transdução de sinais.

A **Seção VI** inclui quinze tópicos especiais: nutrição, digestão e absorção; micronutrientes vitaminas e minerais; radicais livres e nutrientes antioxidantes; tráfego intracelular e seleção das proteínas; glicoproteínas; a matriz extracelular; o músculo e o citoesqueleto; proteínas plasmáticas e imunoglobulinas; hemostasia e trombose; eritrócitos e leucócitos; metabolismo dos xenobióticos; a bioquímica do envelhecimento; câncer: considerações gerais; bioquímica clínica e 16 estudos de caso orientados bioquimicamente. O último capítulo conclui com um breve epílogo indicando alguns dos principais desafios da medicina para os quais a bioquímica e as disciplinas relacionadas desempenharão papéis importantes na busca de soluções.

O **Apêndice** lista *sites* importantes na internet e periódicos de bioquímica e outros com conteúdo de bioquímica significativo.

Agradecimentos

Agradecemos a Michael Weitz pelo planejamento desta edição e a Brian Kearns por deixá-la pronta para publicação. Também agradecemos à Mala Arora e a seus colaboradores da Thomson Digital por seus esforços nas etapas de projeto gráfico e editoração, e a Calvin "Nic" Steussy, da Purdue University, por seu auxílio na produção da ilustração da capa.

Sugestões de estudantes e colegas em todo o mundo foram muito úteis na formulação desta edição. Esperamos receber estímulos semelhantes no futuro.

Rob Murray reconhece, com gratidão, Joe Varghese e Molly Jacob como coautores dos Capítulos 50, 55 e 56; Fred Keeley, por suas contribuições ao Capítulo 48; Peter Gross pela coautoria dos Capítulos 51 e 57 e Margaret Rand pela coautoria do Capítulo 51. Agradecimentos especiais a Reinhart Reithmeier, Alan Volchuk e David Williams por revisarem e terem feito sugestões inestimáveis para os Capítulos 40 e 46.

Robert K. Murray
David A. Bender
Kathleen M. Botham
Peter J. Kennelly
Victor W. Rodwell
P. Anthony Weil

Sumário

1 Bioquímica e Medicina 1
Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

2 Água e pH 7
Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

SEÇÃO I — Estruturas e Funções de Proteínas e Enzimas 17

3 Aminoácidos e Peptídeos 17
Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

4 Proteínas: Determinação da Estrutura Primária 25
Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

5 Proteínas: Ordens de Estrutura Superiores 35
Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

6 Proteínas: Mioglobina e Hemoglobina 48
Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

7 Enzimas: Mecanismo de Ação 57
Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

8 Enzimas: Cinética 70
Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

9 Enzimas: Regulação das Atividades 84
Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

10 Bioinformática e Biologia Computacional 94
Peter J. Kennely, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

SEÇÃO II — Bioenergética e Metabolismo dos Carboidratos e Lipídeos 109

11 Bioenergética: A Função do ATP 109
Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

12 Oxidação Biológica 115
Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

13 A Cadeia Respiratória e a Fosforilação Oxidativa 121
Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

14 Carboidratos com Importância Fisiológica 132
David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

15 Lipídeos com Importância Fisiológica 140
Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

16 Visão Geral do Metabolismo e Suprimento de Combustíveis Metabólicos 151
David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

17 O Ciclo do Ácido Cítrico: O Catabolismo da Acetil-CoA 163
David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

18 Glicólise e Oxidação do Piruvato 170
David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

19 Metabolismo do Glicogênio 178
David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

20 Gliconeogênese e o Controle da Glicemia 187
David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

21 A Via das Pentoses-Fosfato e Outras Vias do Metabolismo das Hexoses 197
David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

22 Oxidação dos Ácidos Graxos: Cetogênese 207
Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

23 Biossíntese dos Ácidos Graxos e Eicosanoides 216
Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

24 Metabolismo dos Acilgliceróis e Esfingolipídeos 229
Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

25 Transporte e Armazenamento de Lipídeos 237
Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

26 Síntese, Transporte e Excreção do Colesterol 250
Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

SEÇÃO III **Metabolismo das Proteínas e dos Aminoácidos 265**

27 Biossíntese dos Aminoácidos Nutricionalmente Não Essenciais 265
Victor W. Rodwell, Ph.D.

28 Catabolismo das Proteínas e do Nitrogênio dos Aminoácidos 271
Victor W. Rodwell, Ph.D.

29 Catabolismo dos Esqueletos Carbônicos dos Aminoácidos 281
Victor W. Rodwell, Ph.D.

30 Conversão dos Aminoácidos em Produtos Especializados 297
Victor W. Rodwell, Ph.D.

31 Porfirinas e Pigmentos Biliares 307
Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

SEÇÃO IV **Estrutura, Função e Replicação das Macromoléculas Informativas 323**

32 Nucleotídeos 323
Victor W. Rodwell, Ph.D.

33 Metabolismo dos Nucleotídeos das Purinas e Pirimidinas 331
Victor W. Rodwell, Ph.D.

34 Estrutura e Função do Ácido Nucleico 343
P. Anthony Weil, Ph.D.

35 Organização, Replicação e Reparo do DNA 354
P. Anthony Weil, Ph.D.

36 Síntese, Processamento e Modificação do RNA 377
P. Anthony Weil, Ph.D.

37 A Síntese de Proteínas e o Código Genético 395
P. Anthony Weil, Ph.D.

38 Regulação da Expressão Gênica 411
P. Anthony Weil, Ph.D.

39 Genética Molecular, DNA Recombinante e Tecnologia Genômica 434
P. Anthony Weil, Ph.D.

SEÇÃO V Bioquímica da Comunicação Extracelular e Intracelular 459

40 Membranas: Estrutura e Função 459
Robert K. Murray, M.D., Ph.D. e Daryl K. Granner, M.D.

41 A Diversidade do Sistema Endócrino 478
P. Anthony Weil, Ph.D.

42 Ação dos Hormônios e Transdução de Sinais 498
P. Anthony Weil, Ph.D.

SEÇÃO VI Tópicos Especiais 517

43 Nutrição, Digestão e Absorção 517
David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

44 Micronutrientes: Vitaminas e Minerais 525
David A. Bender, Ph.D.

45 Radicais Livres e Nutrientes Antioxidantes 543
David A. Bender, Ph.D.

46 Tráfego Intracelular e Seleção das Proteínas 548
Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

47 Glicoproteínas 568
Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

48 A Matriz Extracelular 589
Robert K. Murray, M.D., Ph.D. e Frederick W. Keeley, Ph.D.

49 O Músculo e o Citoesqueleto 608
Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

50 Proteínas Plasmáticas e Imunoglobulinas 629
Robert K. Murray, M.D., Ph.D., Molly Jacob, M.B. B.S., M.D., Ph.D., e Joe Varghese, M.B. B.S., M.D.

51 Hemostasia e Trombose 650
Peter L. Gross, M.D., M.Sc., FRCP (C), Robert K. Murray, M.D., Ph.D. e Margaret L. Rand, Ph.D.

52 Eritrócitos e Leucócitos 660
Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

53 Metabolismo dos Xenobióticos 676
Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

54 A Bioquímica do Envelhecimento 684
Peter J. Kennelly, Ph.D.

55 Câncer: Considerações Gerais 697
Robert K. Murray, M.D., Ph.D., Molly Jacob, M.B. B.S., M.D., Ph.D., e Joe Varghese, M.B. B.S., M.D.

56 Bioquímica Clínica 719
Joe Varghese, M.B. B.S., M.D., Molly Jacob, M.B. B.S., M.D., Ph.D., e Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

57 Estudos de Caso Bioquímicos 729
Robert K. Murray, M.D., Ph.D. e Peter L. Gross, M.D., M.Sc., FRCP(C)

Apêndice 769
Banco de Respostas 773
Índice 777

Aspectos Essenciais da 29ª Edição de *Bioquímica Ilustrada de Harper*

Este livro esclarece a ligação entre a bioquímica e a base molecular das doenças como nenhum outro

- Inclui 16 estudos de casos, importantes para relacionar a teoria à prática.
- Novos capítulos sobre Envelhecimento, Câncer e Bioquímica clínica.
- Todos os capítulos foram atualizados refletindo os principais avanços e descobertas.
- Cada capítulo inicia com a indicação de objetivos, seguidos por uma breve discussão sobre a importância bioquímica dos tópicos discorridos ao longo do texto.
- 250 perguntas de múltipla escolha testam o conhecimento e a compreensão do assunto abordado.
- Maior número de tabelas que destacam informações fundamentais, como a necessidade de vitaminas e minerais.
- Discussão ampliada sobre os RNAs não codificadores, reparo de dano de DNA e doenças humanas, atividades dos miRNAs e novos ensaios poderosos para monitorar e caracterizar a transcrição pangenômica.
- Discussão aprofundada do metabolismo de ferro na saúde e na doença.
- Ilustrações coloridas de alta qualidade com cobertura integrada das doenças bioquímicas e informação clínica.

Descrição dos objetivos na abertura do capítulo

CAPÍTULO 50

Proteínas Plasmáticas e Imunoglobulinas

Robert K. Murray, M.D., Ph.D., Molly Jacob, M.B. B.S., M.D., Ph.D., e Joe Varghese, M.B. B.S., M.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Citar as principais funções do sangue.
- Explicar as funções das principais proteínas plasmáticas, incluindo albumina, haptoglobina, transferrina, ceruloplasmina, α_1-antitripsina e α_2-macroglobulina.
- Descrever como a homeostasia do ferro é mantida e como é afetada em determinados distúrbios.
- Detalhar as estruturas gerais e as funções das cinco classes de imunoglobulinas e o uso de anticorpos monoclonais.
- Reconhecer que o sistema complemento está envolvido em vários processos biológicos importantes.
- Indicar as causas da doença de Wilson, da doença de Menkes, das doenças pulmonares e hepáticas associadas à deficiência de α_1-antitripsina, da amiloidose, do mieloma múltiplo e da agamaglobulinemia.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

O papel fundamental do sangue na manutenção da **homeostasia** (ver Capítulo 51) e a facilidade com que se obtêm amostras de sangue explicam por que o estudo de seus constituintes teve importância central no desenvolvimento da bioquímica e da bioquímica clínica. Este capítulo descreve as propriedades básicas de algumas **proteínas plasmáticas**, incluindo as **imunoglobulinas** (anticorpos). Ocorrem alterações quantitativas de várias proteínas plasmáticas e imunoglobulinas em muitas doenças, e essas alterações podem ser monitoradas por eletroforese ou por outros procedimentos apropriados. Conforme descrito em um dos capítulos anteriores, as alterações nas atividades de determinadas **enzimas** encontradas no plasma têm aplicação diagnóstica em diversas condições patológicas. As proteínas plasmáticas envolvidas na coagulação sanguínea são discutidas no Capítulo 51.

O SANGUE DESEMPENHA NUMEROSAS FUNÇÕES

As funções do sangue – exceto as funções celulares específicas, como transporte de oxigênio e defesa imunológica celular – são desempenhadas pelo plasma e por seus constituintes (**Tabela 50-1**).

O **plasma** consiste em água, eletrólitos, metabólitos, nutrientes, proteínas e hormônios. A composição eletrolítica do plasma é praticamente a mesma que a de todos os líquidos extracelulares. As dosagens laboratoriais dos níveis de Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cl^-, HCO_3^-, $PaCO_2$ e do pH sanguíneo são importantes no tratamento de muitos pacientes.

O PLASMA CONTÉM UMA MISTURA COMPLEXA DE PROTEÍNAS

A concentração de proteína total no plasma humano é de aproximadamente 7,0 a 7,5 g/dL, e essas proteínas constituem o principal componente sólido do plasma. Na verdade, as proteínas do plasma consistem em uma mistura complexa, que inclui não apenas as proteínas simples, mas também proteínas conjugadas, como as **glicoproteínas** e vários tipos de **lipoproteínas**. A aplicação de técnicas da proteômica possibilita o isolamento e a caracterização de proteínas plasmáticas até então desconhecidas, algumas presentes em quantidades muito pequenas (p. ex., detectadas no líquido de hemodiálise e no plasma de pacientes com câncer), ampliando, assim, o **proteoma plasmático**. Existem milhares de **anticorpos** no plasma humano, embora a quantidade de qualquer anticorpo específico geralmente seja muito pequena

TABELA 48-1 Tipos de colágeno e seus genes[1]

Tipo	Genes	Tecido
I	*COL1A1, COL1A2*	A maioria dos tecidos conectivos, inclusive o osso
II	*COL2A1*	Cartilagem, humor vítreo
III	*COL3A1*	Tecidos conectivos extensíveis, como a pele, os pulmões e o sistema vascular
IV	*COL4A1-COL4A6*	Membranas basais
V	*COL5A1-COL5A3*	Componente menor em tecidos que contêm colágeno I
VI	*COL6A1-COL6A3*	A maioria dos tecidos conectivos
VII	*COL7A1*	Fibrilas de ancoragem
VIII	*COL8A1-COL8A2*	Endotélio, outros tecidos
IX	*COL9A1-COL9A3*	Tecidos que contêm colágeno II
X	*COL10A1*	Cartilagem hipertrófica
XI	*COL11A1, COL11A2, COL2A1*	Tecidos que contêm colágeno II
XII	*COL12A1*	Tecidos que contêm colágeno I
XIII	*COL13A1*	Muitos tecidos
XIV	*COL14A1*	Tecidos que contêm colágeno I
XV	*COL15A1*	Muitos tecidos
XVI	*COL16A1*	Muitos tecidos
XVII	*COL17A1*	Hemidesmossomos da pele
XVIII	*COL18A1*	Muitos tecidos (p. ex., fígado, rim)
XIX	*COL19A1*	Células do rabdomiossarcoma

Fonte: Adaptada parcialmente de Prockop DJ, Kivirikko KI: Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. Annu Rev Biochem 1995;64:403. Copyright © 1995 by Annual Reviews, www.annualreviews.org. Reimpressa com autorização.
[1]Os tipos de colágeno são designados por algarismos romanos. As cadeias do pró-colágeno constituintes, denominadas cadeias pró-α, são numeradas com algarismos arábicos, seguidos do tipo de colágeno entre parênteses. Por exemplo, o pró-colágeno tipo I é formado por duas cadeias pró-α(I) e uma cadeia pró-α2 (I). Trata-se, portanto, de um heterotrímero, enquanto o pró-colágeno do tipo 2 é formado por três cadeias de pró-α1 (II) e, portanto, é um homotrímero. Os genes do colágeno são designados de acordo com o tipo de colágeno, escrito em algarismos arábicos para o símbolo do gene, seguidos de uma letra A e do número da cadeia pró-α que ele codifica. Assim, os genes *COL1A1* e *COL1A2* codificam as cadeias α1 e α2 do colágeno do tipo I, respectivamente. Atualmente, já foram identificados pelo menos 28 tipos de colágeno.

base nas estruturas que eles formam. Neste capítulo, trataremos principalmente dos **colágenos I e II**, os quais formam fibrilas e que constituem os principais colágenos da pele e do osso e da cartilagem, respectivamente. Todavia, serão também mencionados alguns dos outros colágenos.

O COLÁGENO É A PROTEÍNA MAIS ABUNDANTE NO REINO ANIMAL

Todos os tipos de colágeno apresentam uma **estrutura helicoidal tripla**. Em alguns colágenos, toda a molécula forma uma tripla-hélice, ao passo que, em outros, a tripla-hélice pode constituir apenas uma parte da estrutura. O colágeno tipo I maduro, que contém cerca de 1.000 aminoácidos, pertence ao primeiro tipo; neste colágeno, cada subunidade polipeptídica ou cadeia alfa é torcida em uma hélice de poliprolina orientada para a esquerda de três resíduos por giro (**Figura 48-1**). Em seguida, três dessas cadeias alfa são torcidas em uma **super-hélice orientada para a**

TABELA 48-2 Classificação dos colágenos com base principalmente nas estruturas que eles formam

Classe	Tipo
Formação de fibrilas	I, II, III, V e XI
Semelhante a uma rede	IV, VIII, X
FACIT[2]	IX, XII, XIV, XVI, XIX
Filamentos em esferas	VI
Fibrilas de ancoragem	VII
Domínio transmembrana	XIII, XVII
Outras	XV, XVIII

Fonte: Com base em Prockop DJ, Kivirikko KI: Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. Annu Rev Biochem 1995;64:403. Copyright © 1995 by Annual Reviews. Reimpressa com autorização.
[2]FACIT — colágenos associados a fibrilas, com tripla-hélices interrompidas. Foram identificados outros colágenos além daqueles listados acima.

Número maior de tabelas

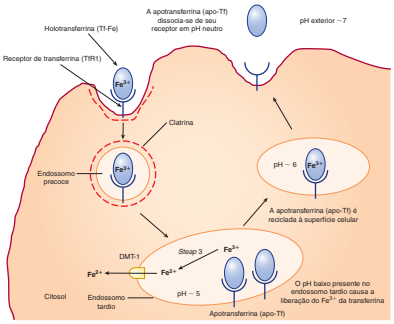


FIGURA 50-6 O ciclo da transferrina. A holotransferrina (Tf-Fe) liga-se ao receptor de transferrina 1 (TfR1) presente em depressões revestidas de clatrina na superfície celular. O complexo TfR1-Tf-Fe sofre endocitose, e as vesículas endocíticas fundem-se para formar os endossomos precoces. Estes endossomos precoces amadurecem em endossomos tardios, cujo interior tem pH ácido. O pH baixo causa a liberação de ferro dos sítios de ligação da transferrina. A apotransferrina (apo-Tf) permanece ligada ao TfR1. O ferro férrico é convertido em sua forma ferrosa pela ferri-redutase, Steap 3. Em seguida, o ferro em sua forma ferrosa é transportado para o citosol pelo DMT1. O complexo TfR1-apo-Tf é reciclado de volta à superfície celular. Na superfície celular, a apo-Tf é liberada do TFR1. Em seguida, o TfR1 liga-se a uma nova Tf-Fe. Esta etapa completa o ciclo da transferrina. (Com base na Figura 17-48 em Lodish H et al: *Molecular Cell Biology*, 4th ed. WH Freeman, 2000.)

A homeostasia intracelular do ferro é rigorosamente regulada

A síntese de TfR1 e da ferritina estão ligadas de modo recíproco ao conteúdo intracelular de ferro. Quando os níveis de ferro estão elevados, a ferritina é sintetizada para armazenar o ferro, e, como não há necessidade de captação adicional de ferro, a síntese do TfR1 é inibida. Em contrapartida, quando os níveis de ferro estão baixos, a ferritina não é sintetizada enquanto ocorre síntese de TfR1 para promover a captação de ferro a partir da transferrina no sangue.

Os mecanismos envolvidos na regulação da síntese da ferritina e do TfR1 foram elucidados (**Figura 50-8**). Esses mecanismos operam por meio da regulação da estabilidade dos mRNAs para a ferritina e o TfR1. Os mRNAs da ferritina e do TfR1 contêm **elementos de resposta ao ferro (IRE)**, que formam alças em grampo em suas regiões não traduzidas (UTR) 5′ e 3′, respectivamente. Os IRE estão ligados a **proteínas reguladoras do ferro (IRP)**. As IRP são sensíveis aos níveis intracelulares de ferro e são induzidas pela presença de baixos níveis do metal. Ligam-se aos IRE apenas quando os níveis intracelulares de ferro estão baixos. A ligação da IRP ao IRE na 3′ UTR do mRNA do TfR1 estabiliza esse mRNA, aumentando, assim, a síntese de TfR1 e a sua expressão na superfície celular. Por outro lado, a ligação da IRP ao IRE na 5′ UTR do mRNA da ferritina bloqueia a tradução da ferritina. Do mesmo modo, na ausência de ligação da IRP ao IRE (que ocorre na presença de altos níveis de ferro), a tradução do mRNA da ferritina é facilitada, e o mRNA do TfR1 é rapidamente degradado. O resultado final é que, quando os níveis intracelulares de ferro estão elevados, a ferritina é sintetizada, mas não o TfR1, ao passo que, quando os níveis intracelulares de ferro estão baixos, ocorre síntese do TfR1, mas não da ferritina. Isso fornece um exemplo clássico de controle da expressão das proteínas em nível traducional.

A hepcidina constitui o principal regulador da homeostasia sistêmica do ferro

A **hepcidina** é uma proteína que desempenha um papel central na homeostasia do ferro no organismo. É sintetizada pelo fígado como uma proteína precursora de 84 aminoácidos (pró-hepcidina). A pró-hepcidina é clivada, gerando a hepcidina bioativa,

Ilustrações coloridas

Questões para Estudo

Seção V

1. Em relação aos lipídeos da membrana, assinale a única resposta INCORRETA.
   A. O principal fosfolipídeo por massa nas membranas dos seres humanos é geralmente a fosfatidilcolina.
   B. Os glicolipídeos estão localizados nas lâminas interna e externa da membrana plasmática.
   C. O ácido fosfatídico é um precursor da fosfatidilcolina, mas não da fosfatidiletanolamina.
   D. A fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina estão localizadas principalmente na lâmina externa da membrana plasmática.
   E. O *"flip-flop"* dos fosfolipídeos nas membranas é muito lento.
2. Em relação às proteínas da membrana, assinale a única resposta INCORRETA.
   A. Devido a considerações estéricas, não podem existir hélices α nas membranas.
   B. Um gráfico de hidropatia ajuda a estimar se um determinado segmento de uma proteína é predominantemente hidrofóbico ou hidrofílico.
   C. Algumas proteínas estão ancoradas na lâmina externa da membrana plasmática por estruturas de glicofosfatidilinositol (GPI).
   D. A adenilil-ciclase é um marcador enzimático da lâmina plasmática.
   E. A mielina apresenta um teor muito alto de lipídeos em comparação com as proteínas.
3. No que se refere ao transporte nas membranas, assinale a única afirmação INCORRETA.
   A. O potássio apresenta uma menor densidade de carga do que o sódio e tende a atravessar as membranas mais rapidamente do que o sódio.
   B. O fluxo de íons por canais iônicos fornece um exemplo de transporte passivo.
   C. A difusão facilitada requer uma proteína como transportador.
   D. A inibição da Na^+K^+-ATPase inibe a captação dependente de sódio da glicose nas células intestinais.
   E. A insulina, ao recrutar transportadores da glicose na membrana plasmática, aumenta a captação de glicose nas células adiposas, mas não no músculo.
4. Em relação à Na^+K^+-ATPase, assinale a única afirmação INCORRETA.
   A. A sua ação mantém a alta concentração intracelular de sódio em comparação com a de potássio.
   B. Pode utilizar até 30% do consumo total de ATP de uma célula.
   C. É inibida pelos digitálicos, que são fármacos úteis em determinadas condições cardíacas.
   D. Localiza-se na membrana plasmática das células.
   E. A fosforilação está envolvida em seu mecanismo de ação, levando à sua classificação como transportador ativo impulsionado por ATP tipo P.
5. Quais as moléculas que permitem à célula responder a uma molécula sinalizadora extracelular específica?
   A. Carboidratos receptores específicos localizados na superfície interna da membrana plasmática.
   B. Bicamada lipídica plasmática.
   C. Canais iônicos.
   D. Receptores que reconhecem especificamente e ligam-se à molécula mensageira específica.
   E. Membranas nucleares intactas.
6. Indique o termo geralmente aplicado às moléculas mensageiras extracelulares que se ligam a proteínas receptoras transmembrana:
   A. Inibidor competitivo
   B. Ligante
   C. Curva de *scatchard*
   D. Substrato
   E. Chave
7. Na sinalização autócrina:
   A. As moléculas mensageiras alcançam as células-alvo por meio de sua passagem pela corrente sanguínea.
   B. As moléculas mensageiras percorrem apenas curtas distâncias por meio do espaço extracelular até células que estão próximas à célula que está gerando a mensagem.
   C. A célula que produz a mensagem expressa receptores em sua superfície que podem responder a este mensageiro.
   D. As moléculas mensageiras são, em geral, rapidamente degradadas e, portanto, só podem atuar em distâncias curtas.
8. Independentemente do modo pelo qual um determinado sinal é iniciado, o evento de ligação de ligante é propagado pelos mensageiros secundários ou recrutamento de proteínas. Qual o resultado final desses eventos de ligação?
   A. Ocorre ativação de uma proteína no meio de uma via de sinalização intracelular.
   B. Ocorre ativação de uma proteína na parte superior de uma via de sinalização intracelular.
   C. Ocorre ativação de uma proteína na parte superior de uma via de sinalização extracelular.
   D. Ocorre desativação de uma proteína na parte superior de uma via de sinalização intracelular.
   E. Ocorre ativação de uma proteína na parte inferior de uma via de sinalização intracelular.
9. Quais as características da superfamília de receptores nucleares que sugerem que essas proteínas evoluíram a partir de um ancestral comum?
   A. Todas elas se ligam ao mesmo ligante com alta afinidade.
   B. Todas elas funcionam dentro do núcleo.
   C. Todas elas estão sujeitas à fosforilação reguladora.
   D. Todas elas contêm regiões de alta semelhança/identidade na sequência de seus aminoácidos.
10. Que efeito a degradação dos complexos receptor-ligante após a sua internalização tem sobre a capacidade de uma célula de responder se for imediatamente exposta de novo ao mesmo hormônio?

Mais de 250 questões de múltipla escolha

CAPÍTULO

1

Bioquímica e Medicina

Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Explicar sobre o que a bioquímica trata e entender o seu papel central nas ciências da vida.
- Compreender a relação da bioquímica com a saúde, a doença e a medicina.
- Avaliar a origem do Projeto Genoma Humano, ou o interesse estimulado em inúmeras disciplinas que já estão esclarecendo muitos aspectos da biologia e da medicina.

INTRODUÇÃO

A bioquímica pode ser definida como *a ciência da base química da vida* (do grego *bios*, vida). A **célula** é a unidade estrutural dos sistemas vivos. Desta maneira, a bioquímica também pode ser descrita como *o estudo dos constituintes químicos das células vivas e das reações e processos a que são submetidas*. Por esta definição, a bioquímica engloba grandes áreas da **biologia celular**, **biologia molecular** e **genética molecular**.

O objetivo da bioquímica é descrever e explicar, em termos moleculares, todos os processos químicos das células vivas

O **principal objetivo** da bioquímica é **a compreensão completa, a nível molecular, de todos os processos químicos associados às células vivas**. Para atingir tal objetivo, os bioquímicos procuraram isolar as inúmeras moléculas encontradas nas células, determinar suas estruturas e analisar como elas atuam. Muitas técnicas foram empregadas para estas finalidades; algumas delas estão resumidas na **Tabela 1-1**.

Os **outros objetivos** da bioquímica incluem ajudar a **compreender as origens da vida na Terra** e a integrar o conhecimento bioquímico aos esforços para **manter a saúde**, **compreender as doenças e tratá-las de maneira efetiva**.

Um conhecimento da bioquímica é essencial para todas as ciências da vida

A bioquímica dos ácidos nucleicos se localiza no centro da **genética**; por sua vez, o uso de condutas genéticas tem sido crítico para elucidar muitas áreas da bioquímica. A **biologia celular** é uma aliada muito próxima à bioquímica. A **fisiologia**, o estudo da função orgânica, sobrepõe-se à bioquímica quase por completo. A **imunologia** emprega inúmeras técnicas bioquímicas, sendo que muitas abordagens imunológicas encontraram uso disseminado pelos bioquímicos. A **farmacologia** e a **farmácia** repousam sobre um conhecimento adequado da bioquímica e fisiologia; em particular, a maioria dos medicamentos é metabolizada por reações catalisadas por enzimas. Os venenos atuam sobre reações ou processos bioquímicos; este é o tema da **toxicologia**. As condutas bioquímicas estão sendo empregadas crescentemente nos estudos dos aspectos básicos da **patologia** (o estudo da doença), como a inflamação, a lesão celular e o câncer. Muitos pesquisadores em **microbiologia**, **zoologia** e **botânica** empregam abordagens bioquímicas de forma quase exclusiva. Essas relações não geram surpresa, porque a vida como se conhece depende de reações e processos bioquímicos. Na realidade, as antigas barreiras entre as ciências da vida estão se quebrando, e a bioquímica está se tornando a sua **linguagem comum**.

Uma relação recíproca entre a bioquímica e a medicina estimulou avanços mútuos

As duas principais preocupações para os pesquisadores nas ciências da saúde – e particularmente os médicos – são a compreensão e a manutenção da **saúde** e a compreensão e o tratamento efetivo

TABELA 1-1 Os principais métodos e preparações utilizados nos laboratórios bioquímicos

Métodos de separação e purificação de biomoléculas[1]
Fracionamento salino (p. ex., precipitação de proteínas com sulfato de amônio)
Cromatografia: papel, troca iônica, afinidade, camada delgada, gás-líquido, líquido de alta pressão, filtração em gel
Eletroforese: papel, alta voltagem, agarose, acetato de celulose, gel de amido, gel de poliacrilamida, gel de SDS-poliacrilamida
Ultracentrifugação
Métodos para determinar as estruturas biomoleculares
Análise elementar
UV, visível, infravermelho, espectroscopia RM
Uso de hidrólise ácida ou alcalina para degradar a biomolécula sob estudo em seus constituintes básicos
Uso de uma bateria de enzimas de especificidade conhecida para degradar a biomolécula em estudo (p. ex., proteases, nucleases, glicosidases)
Espectrometria de massa
Métodos de sequenciamento específico (p. ex., para proteínas e ácidos nucleicos)
Cristalografia por raios X
Preparações para o estudo dos processos bioquímicos
Animal integral (inclui animais transgênicos e animais com bloqueios genéticos)
Órgão perfundido isolado
Fatia de tecido
Células íntegras
Homogeneizado
Organelas celulares isoladas
Subfracionamento das organelas
Enzimas e metabólitos purificados
Genes isolados (incluindo a reação de cadeia de polimerase e mutagênese sítio-dirigida)

[1]Grande parte destes métodos são apropriados para analisar os componentes existentes em homogeneizados celulares e em outras preparações bioquímicas. O uso sequencial de várias técnicas geralmente permitirá a purificação da maioria das biomoléculas. O leitor pode consultar mais detalhes nos textos sobre os métodos de pesquisa bioquímica.

das **doenças**. A bioquímica tem um impacto enorme sobre essas duas preocupações fundamentais da medicina. De fato, a inter-relação entre a bioquímica e a medicina é uma rua larga de mão dupla. Os estudos bioquímicos iluminaram muitos aspectos da saúde e doença e, em contrapartida, o estudo de vários aspectos da saúde e da doença abriram novas áreas da bioquímica. Alguns exemplos desse caminho de mão dupla são mostrados na **Figura 1-1**. Por exemplo, o conhecimento da estrutura e função da proteína foi necessário para elucidar a diferença bioquímica única entre a **hemoglobina normal** e a **hemoglobina falciforme**. Por outro lado, a análise da hemoglobina falciforme contribuiu de forma significativa para nossa compreensão da estrutura e função da hemoglobina normal e de outras proteínas. Os exemplos análogos do benefício recíproco entre a bioquímica e a medicina poderiam ser citados para outros itens pareados, conforme mostrado na Figura 1-1. Outro exemplo é o trabalho pioneiro de Archibald Garrod, um médico que estava na Inglaterra durante o início dos anos 1900. Ele estudou pacientes com inúmeros distúrbios relativamente raros (alcaptonúria, albinismo, cistinúria e pentosúria; estes são descritos nos capítulos posteriores) e estabeleceu que essas condições eram determinadas geneticamente. Garrod chamou essas condições de **erros inatos do metabolismo**. Suas visões proporcionaram uma base importante para o desenvolvimento do campo da genética bioquímica humana. Esforços mais recentes para compreender a base da doença genética conhecida como **hipercolesterolemia familiar**, a qual resulta em aterosclerose grave em uma idade precoce, levaram ao dramático progresso na compreensão dos receptores celulares e dos mecanismos de captação do colesterol para dentro das células. Estudos de **oncogenes** e dos **genes supressores de tumor** em células cancerosas direcionaram a atenção para os mecanismos moleculares envolvidos no controle do crescimento da célula normal. Esses e muitos outros exemplos enfatizam como o estudo da doença pode abrir áreas da função celular para a pesquisa bioquímica básica.

A **relação entre a medicina e a bioquímica** tem importantes implicações para a primeira. Enquanto o tratamento médico estiver firmemente fundamentado no conhecimento da bioquímica e de outras ciências básicas, a prática da medicina terá uma **base racional** que pode ser adaptada para acomodar novos conhecimentos. Isso contrasta com práticas de saúde não ortodoxas e com pelo menos algumas práticas de "medicina alternativa" que, com frequência, se fundamentam em pouco mais que um mito e uma ilusão, carecendo, em geral, de qualquer base intelectual.

A bioquímica é uma importante área da ciência. As muitas maneiras pelas quais **a ciência é importante para os médicos** (e igualmente importante para outros profissionais no cuidado da saúde ou biologia, quer relacionados com os seres humanos ou animais) foram bem delineadas no artigo escrito por Cooke (2010). Elas incluem (i) oferecer uma compreensão básica sobre a qual deve ser construída a prática do profissional, (ii) estimular a curiosidade e criar os hábitos científicos que são essenciais para o aprendizado contínuo durante toda a sua carreira, (iii) mostrar como foi adquirido o conhecimento atual, e (iv) enfatizar a imensidão do que ainda é desconhecido. É claro que é vital que a aplicação da ciência para ajudar um paciente deve ser praticada com humanidade e com os mais elevados padrões éticos.

OS PROCESSOS BIOQUÍMICOS NORMAIS CONSTITUEM A BASE DA SAÚDE

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define **saúde** como um estado de "bem-estar físico, mental e social completo e não simplesmente a ausência de doença e enfermidade". A partir de um

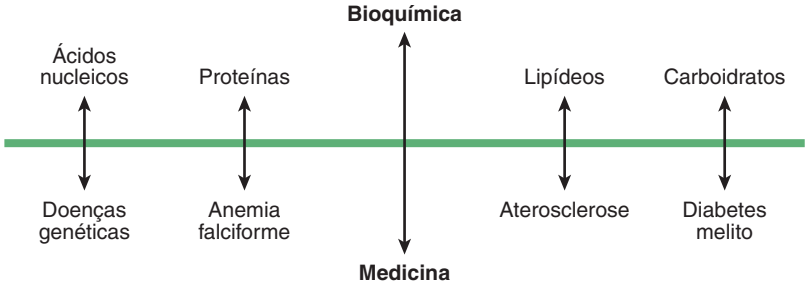


FIGURA 1-1 Exemplos de vias de mão dupla que unem a bioquímica e a medicina. O conhecimento das moléculas bioquímicas mostradas na parte superior do diagrama esclareceu a compreensão das doenças mostradas na metade inferior e, em contrapartida, as análises das doenças mostradas abaixo iluminaram muitas áreas da bioquímica. Observe que a anemia falciforme é uma doença genética e que tanto a aterosclerose quanto o diabetes melito possuem componentes genéticos.

ponto de vista estritamente bioquímico, a saúde pode ser considerada aquela situação em que a totalidade dos muitos milhares de reações intra e extracelulares que ocorrem no corpo estão acontecendo em velocidades que são compatíveis com a sobrevida máxima do organismo no estado fisiológico. No entanto, esta é uma visão extremamente reducionista e deve ficar evidente que cuidar da saúde do paciente requer não apenas um amplo conhecimento dos **princípios biológicos**, mas também dos princípios **psicológicos** e **sociais**.

A pesquisa bioquímica tem impacto sobre a nutrição e a medicina preventiva

Um pré-requisito importante para a manutenção da saúde é a ingestão nutricional ótima de inúmeras substâncias químicas; dentre estas, as principais são as **vitaminas**, determinados **aminoácidos**, certos **ácidos graxos**, diversos **minerais** e a **água**. Como grande parte do tema, tanto da **bioquímica** quanto da **nutrição**, está relacionada com o estudo de vários aspectos dessas substâncias químicas, há uma íntima relação entre essas duas ciências. Além disso, maior ênfase está sendo colocada sobre as tentativas sistemáticas de manter a saúde e evitar a doença, isto é, sobre a **medicina preventiva**. Desta maneira, as condutas nutricionais e, por exemplo, a prevenção da aterosclerose e do câncer, estão recebendo maior atenção. Compreender a nutrição depende, em grande parte, do conhecimento da bioquímica.

A maioria das doenças tem, e talvez todas tenham, uma base bioquímica

Acredita-se que a maioria das doenças, se não todas são manifestações de anormalidades de moléculas, reações químicas ou processos bioquímicos. Os **principais fatores responsáveis por causar doenças** em animais e seres humanos estão listados na **Tabela 1-2**. Todos eles afetam uma ou mais reações químicas ou moléculas críticas no organismo. Inúmeros exemplos das bases bioquímicas das doenças serão encontrados neste texto. Na maioria das doenças, os estudos bioquímicos contribuem tanto para o diagnóstico quanto para o tratamento. Alguns dos **principais usos das pesquisas bioquímicas e dos exames laboratoriais em relação às doenças** estão resumidos na Tabela 56-1. O Capítulo 56 descreve muitos aspectos do campo da **bioquímica clínica**, o qual se relaciona principalmente com o uso dos exames bioquímicos para auxiliar no diagnóstico da doença e, também, no controle geral dos pacientes com diversas patologias. O Capítulo 57 ajuda a ilustrar a relação da bioquímica com a doença ao discutir em detalhes alguns aspectos bioquímicos de 16 casos clínicos distintos.

Parte dos **maiores desafios com os quais a medicina e as ciências da saúde correlatas** se defrontam também estão delineados de forma muito resumida no final do Capítulo 57. Ao abordar esses desafios, os estudos bioquímicos já estão e continuarão a estar entremeados com estudos em várias outras disciplinas, como a genética, biologia celular, imunologia, nutrição, patologia e farmacologia. Muitos bioquímicos estão vitalmente interessados em contribuir com as soluções para problemas-chave, como a maneira pela qual a sobrevida da humanidade pode ser garantida, e também na educação do público para sustentar o uso do método científico na resolução de problemas importantes (p. ex., ambientais e outros) com os quais nos confrontamos.

TABELA 1-2 As principais causas de doenças[1]

1. Agentes físicos: trauma mecânico, extremos de temperatura, alterações súbitas na pressão atmosférica, radiação, choque elétrico.
2. Agentes químicos, inclusive medicamentos: determinados compostos tóxicos, fármacos terapêuticos, etc.
3. Agentes biológicos: vírus, bactérias, fungos, formas superiores de parasitas.
4. Falta de oxigênio: perda do suprimento sanguíneo, depleção da capacidade de transporte de oxigênio do sangue, inibição de enzimas oxidativas.
5. Distúrbios genéticos: congênitos, moleculares.
6. Reações imunológicas: anafilaxia, doença autoimune.
7. Desequilíbrios nutricionais: deficiências, excessos.
8. Desequilíbrios endócrinos: deficiências hormonais, excessos.

[1]**Nota**: Todas as causas listadas agem por influenciar os diversos mecanismos bioquímicos na célula ou no organismo.
Fonte: Adaptado, com autorização, de Robbins SL, Cotran RS, Kumar V: *The Pathologic Basis of Disease,* 3rd Ed. Saunders, 1984. Copyright © 1984 Elsevier Inc.. Com autorização da Elsevier.

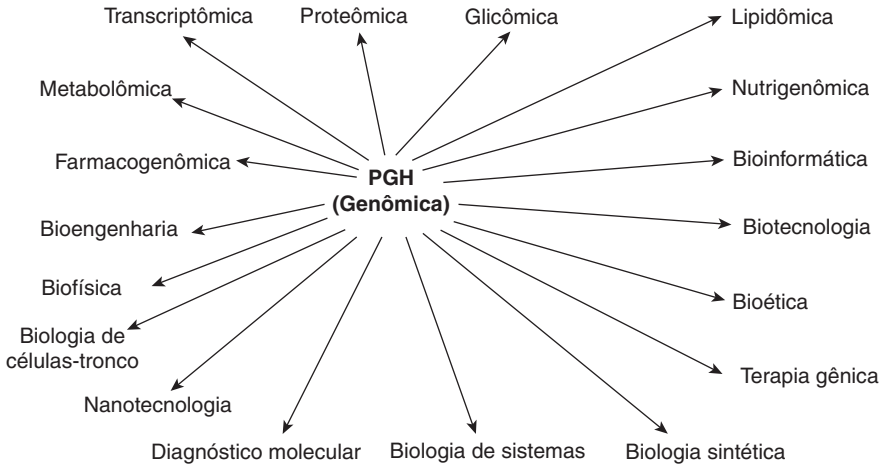


FIGURA 1-2 O Projeto Genoma Humano (PGH) influenciou muitas disciplinas e áreas de pesquisa. A própria bioquímica não é mostrada nesta figura, porque ela está em andamento muito antes do início do PGH. No entanto, inúmeras disciplinas mostradas (p. ex., bioinformática, genômica, glicômica, lipidômica, metabolômica, diagnóstico molecular, proteômica e transcriptômica) são áreas muito ativas de pesquisa pelos bioquímicos.

Impacto do Projeto Genoma Humano (PGH) sobre a bioquímica, a biologia e a medicina

Foi feito um progresso notável no final dos anos 1990 no sequenciamento do genoma humano pelo PGH. Isso culminou em julho de 2000, quando os líderes dos dois grupos envolvidos neste esforço (o International Human Genome Sequencing Consortium e a Celera Genomics, uma companhia privada) anunciaram que mais de 90% do genoma havia sido sequenciado. Versões preliminares da sequência foram publicadas no início de 2001. Com a exceção de alguns hiatos, a sequência de todo o genoma humano foi completada em 2003, 50 anos depois da descrição da natureza de dupla-hélice do DNA por Watson e Crick.

As **implicações** do PGH para a **bioquímica**, toda a **biologia**, e para a **medicina** e **ciências da saúde correlatas** são enormes, sendo que apenas alguns pontos são aqui mencionados. **Agora, é possível isolar qualquer gene e determinar, em geral, sua estrutura** e **função** (p. ex., por experimentos de sequenciamento e quebra). Muitos **genes anteriormente desconhecidos** foram revelados; seus produtos já foram estabelecidos ou estão sob estudo. Uma nova luz foi lançada sobre a **evolução humana**, sendo que os **procedimentos para rastreamento de genes patológicos** foram muito refinados. A referência ao PGH será feita em vários capítulos deste livro.

À medida que aumentam as ramificações do PGH, é vital que os leitores compreendam as **importantes contribuições para a compreensão da saúde e doença humanas** que foram e estão sendo feitas por meio de **estudos dos genomas dos organismos-modelo**, principalmente a *Drosophila melanogaster* (a mosca-da-fruta) e do ***Caenorhabditis elegans*** (o verme cilíndrico). Isso foi claramente delineado por Bruce Alberts (2010) ao refletir sobre o impressionante progresso recente feito na decifração dos genomas desses dois organismos. Como esses organismos podem ser manipulados experimentalmente e apresentam tempos de geração curtos, pode ser feito um progresso relativamente rápido na compreensão das funções normais de seus genes e, também, sobre como as anormalidades de seus genes podem causar doença. Felizmente, estes avanços podem ser traduzidos em condutas que ajudam os seres humanos. De acordo com Alberts: "Por mais incrível que pareça, a pesquisa futura em moscas e vermes frequentemente fornecerá o caminho mais curto e mais eficiente para curar as doenças humanas." Isso se aplica a distúrbios tão distintos quanto o câncer e a doença de Alzheimer.

A **Figura 1-2** mostra **áreas de grande interesse atual** que se desenvolveram quer diretamente como consequência do progresso feito no PGH quanto estimuladas por ele. Como consequência do PGH, muitos dos chamados campos – **ômica** foram estimulados, envolvendo estudos abrangentes das estruturas e funções das moléculas com as quais cada um está relacionado. As definições dos campos listadas adiante são fornecidas no Glossário deste capítulo. Os produtos dos genes (moléculas de RNA e proteínas) estão sendo estudados usando a técnica da **transcriptômica** e **proteômica**. Um exemplo espetacular da velocidade do progresso na transcriptômica é a explosão de conhecimento sobre pequenas moléculas de RNA como reguladoras da atividade do gene. Os outros campos da – ômica incluem **glicômica**, **lipidômica**, **metabolômica**, **nutrigenômica** e **farmacogenômica**. Para se manter atualizada com a quantidade de informação que está sendo produzida, a **bioinformática** recebeu muita atenção. Os outros campos correlatos para os quais o ímpeto decorrente do PGH foi transportado são a **biotecnologia**, **bioengenharia**, **biofísica** e **biotética**. A **nanotecnologia** é uma área ativa que, por exemplo, pode envolver novos métodos de diagnóstico e tratamento **para o câncer** e **outras patologias**. A **biologia da célula-tronco** está no centro de grande parte da pesquisa atual. A **terapia gênica** ainda precisa demonstrar a promessa que ela oferece, mas parece provável que isto irá acontecer mais cedo ou mais tarde. Muitos dos novos **exames diagnósticos moleculares** foram desenvolvidos em áreas como os exames e diagnósticos genéticos, microbiológicos e imunológicos. A **biologia de sistemas** também está florescendo. A **biologia sintética** é, talvez,

a mais intrigante de todas. Esta apresenta o potencial para criar organismos vivos (p. ex., inicialmente pequenas bactérias) a partir do material genético *in vitro*. Estes poderiam ser talvez idealizados para realizar tarefas específicas (p. ex., erradicar os derramamentos de petróleo). Como no caso das células-tronco, esta área atrairá muita atenção dos bioeticistas e de outros. Muitos dos temas acima são referidos mais adiante neste livro.

Tudo o que foi dito anteriormente tornou este momento muito excitante para estudar ou estar diretamente envolvido com a biologia e medicina. Os resultados da pesquisa em várias áreas acima mencionadas terão enorme impacto sobre o futuro da biologia, medicina e ciências da saúde.

RESUMO

- A bioquímica é a ciência relacionada com o estudo das diversas moléculas que ocorrem nas células e organismos vivos e com suas reações químicas. Como a vida depende de reações bioquímicas, a bioquímica tornou-se a linguagem básica de todas as ciências biológicas.
- A bioquímica relaciona-se com todo o espectro de formas de vida, desde vírus e bactérias relativamente simples até seres humanos complexos.
- A bioquímica, a medicina e outras disciplinas dos cuidados da saúde estão intimamente relacionadas. A saúde em todas as espécies depende de um equilíbrio harmonioso das reações bioquímicas que ocorrem no organismo, sendo que a doença reflete as anormalidades nas biomoléculas, reações bioquímicas ou processos bioquímicos.
- Os avanços no conhecimento bioquímico iluminaram muitas áreas da medicina. Em contrapartida, o estudo das doenças revelou aspectos obscuros da bioquímica. As condutas bioquímicas muitas vezes são fundamentais para iluminar as causas das doenças e na idealização das terapias apropriadas.
- O emprego criterioso de vários exames laboratoriais bioquímicos constitui um componente integrante do diagnóstico e da monitoração do tratamento.
- Um conhecimento adequado da bioquímica e de outras disciplinas básicas correlatas é essencial para a prática racional da medicina e das ciências da saúde associadas.
- Os resultados do PGH e da pesquisa em áreas relacionadas terão uma profunda influência sobre o futuro da biologia, medicina e de outras ciências da saúde. Enfatiza-se a importância da pesquisa genômica em organismos-modelo, como a *D. melanogaster* e o *C. elegans*, para a compreensão das doenças humanas.

REFERÊNCIAS

Alberts B: Model organisms and human health. Science 2010;330:1724.

Alberts B: Lessons from genomics. Science 2011;331:511. (In this issue of Science and succeeding issues in February 2011 various scientists comment on the signifi cance of the tenth anniversary of the publications of the sequencing of the human genome).

Cammack R, Attwood T, Campbell P, et al (editors): Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology. 2nd ed. Oxford University Press. 2006.

Cooke M. Science for physicians. Science 2010;329;1573. Feero WG, Guttmacher AE, Collins FS: Genomic medicine—an updated primer. N Eng J Med 2010;362:2001.

Fruton JS: Proteins, Enzymes, Genes: *The Interplay of Chemistry and Biology*. Yale University Press, 1999. (Provides the historical background for much of today's biochemical research.)

Garrod AE: Inborn errors of metabolism. (Croonian Lectures.) Lancet 1908;2:1:73,142,214.

Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, et al: Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. Science 2010;329:52.

Kornberg A: Basic research: Th e lifeline of medicine. FASEB J 1992;6:3143.

Kornberg A: Centenary of the birth of modern biochemistry. FASEB J 1997;11:1209.

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): Center for Medical Genetics, Johns Hopkins University and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, 1997.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/ (Th e numbers assigned to the entries in OMIM will be cited in selected chapters of this work. Consulting this extensive collection of diseases and other relevant entries—specifi c proteins, enzymes, etc—will greatly expand the reader's knowledge and understanding of various topics referred to and discussed in this text. The online version is updated almost daily.)

Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill, 2001 (Th is text is now available online and updated as *The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease* at www.ommbid.com. Subscription is required, although access may be available via university and hospital libraries and other sources).

Scherer S: *A Short Guide to the Human Genome*. CSHL Press, 2008.

Weatherall DJ: Systems biology and red cells. N Engl J Med 2011;364;376.

GLOSSÁRIO

Bioengenharia: a aplicação da engenharia na biologia e medicina.

Bioética: a área da ética que se relaciona com a aplicação dos princípios morais e éticos à biologia e à medicina.

Biofísica: a aplicação da física e sua técnica à biologia e à medicina.

Bioinformática: a disciplina relacionada com a coleta, armazenamento e análise de dados biológicos, principalmente as sequências de DNA e proteína (ver Capítulo 10).

Biologia da célula-tronco: uma célula-tronco é uma célula indiferenciada que apresenta o potencial para se renovar e se diferenciar em qualquer uma das células adultas encontradas no organismo. A biologia da célula-tronco relaciona-se à sua biologia e aos seus usos em várias doenças.

Biologia de sistemas: o campo da ciência em que complexos sistemas biológicos são estudados como um todo integrado (em oposição à conduta reducionista, p. ex., da bioquímica clássica).

Biologia sintética: o campo que combina as técnicas biomoleculares com as condutas de engenharia para construir novas funções e sistemas biológicos.

Biotecnologia: o campo em que as condutas bioquímicas, de engenharia e outras condutas são combinadas para desenvolver produtos biológicos de uso em medicina e na indústria.

Diagnóstico molecular: o emprego de condutas moleculares (p. ex., sondas de DNA) para ajudar no diagnóstico de diversas condições bioquímicas, genéticas, imunológicas, microbiológicas entre outras condições médicas.

Farmacogenômica: o emprego da informação genômica e das tecnologias para aperfeiçoar a descoberta e o desenvolvimento de alvos de medicamentos e medicamentos (ver Capítulo 54).

Genômica: o genoma é o conjunto completo de genes de um organismo (p. ex., o genoma humano) e a genômica é o estudo aprofundado das estruturas e funções dos genomas (ver Capítulo 10 e outros capítulos).

Glicômica: o glicoma é o complemento total de carboidratos simples e complexos em um organismo. A glicômica é o estudo sistemático das estruturas e funções dos glicomas (p. ex., o glicoma humano; ver Capítulo 47).

Lipidômica: o lipidoma é o complemento completo dos lipídeos encontrados em um organismo. A lipidômica é o estudo aprofundado das estruturas e funções de todos os membros do lipidoma e de suas interações, tanto na saúde quanto na doença.

Metabolômica: o metaboloma é o complemento completo dos metabólitos (pequenas moléculas envolvidas no metabolismo) encontrados em um organismo. A metabolômica é o estudo aprofundado de suas estruturas, funções e alterações nos vários estados metabólicos.

Nanotecnologia: o desenvolvimento e a aplicação na medicina e em outras áreas de dispositivos (como nanoescudos, ver Glossário do Capítulo 55) que possuem apenas alguns nanômetros de comprimento (10^{-9} m = 1 nm).

Nutrigenômica: o estudo sistemático dos efeitos dos nutrientes sobre a expressão genética e também dos efeitos das variações genéticas sobre o manuseio dos nutrientes.

Proteômica: o proteoma é o conjunto completo das proteínas de um organismo. A proteômica é o estudo sistemático das estruturas e funções dos proteomas, incluindo as variações na saúde e doença (ver Capítulo 4).

Terapia gênica: aplica-se ao emprego de genes geneticamente construídos para tratar várias doenças (ver Capítulo 39).

Transcriptômica: o transcriptoma é o conjunto complexo de transcrições do RNA produzido pelo genoma em um intervalo de tempo fixo. A transcriptômica é o estudo abrangente da expressão do gene no nível do RNA (ver Capítulo 36 e outros capítulos).

CAPÍTULO

2

Água e pH

Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever as propriedades da água que contribuem para sua tensão superficial, viscosidade, estado líquido na temperatura ambiente e poder solvente.
- Utilizar fórmulas estruturais para representar vários compostos orgânicos que podem servir como aceptores ou doadores de pontes de hidrogênio.
- Explicar o papel desempenhado pela entropia na orientação, em um meio aquoso, das regiões polar e não polar das macromoléculas.
- Indicar as contribuições quantitativas das pontes salinas, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals para a estabilidade das macromoléculas.
- Explicar a relação do pH com a acidez, alcalinidade e os determinantes quantitativos que caracterizam os ácidos fracos e fortes.
- Calcular a variação no pH que acompanha a adição de uma determinada quantidade de ácido ou base ao pH de uma solução tamponada.
- Descrever o que fazem os tampões, como eles atuam e as condições sob as quais um tampão é mais efetivo fisiologicamente ou em outras condições.
- Ilustrar como a equação da Henderson-Hasselbach pode ser utilizada para calcular a carga total sobre um polieletrólito em um determinado pH.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A água é o componente químico predominante dos organismos vivos. Suas propriedades físicas únicas, as quais incluem a capacidade de solvatar uma ampla gama de moléculas orgânicas e inorgânicas, derivam da sua estrutura dipolar e da excepcional capacidade de interação para formar pontes de hidrogênio. A maneira pela qual a água interage com uma biomolécula dissolvida influencia a estrutura tanto da biomolécula quanto da própria água. Um nucleófilo excelente, a água é um reagente ou produto em muitas reações metabólicas. A regulação do equilíbrio da água depende de mecanismos hipotalâmicos que controlam a sede, do hormônio antidiurético (ADH), da retenção ou excreção da água pelos rins e da perda por evaporação. O diabetes insípido nefrogênico, que envolve a incapacidade de concentrar a urina ou o ajuste a alterações sutis na osmolaridade do líquido extracelular, resulta da falta de responsividade dos osmorreceptores tubulares renais ao ADH.

A água apresenta uma ligeira propensão para se dissociar em íons hidróxido e prótons. A concentração dos prótons, ou **acidez**, das soluções aquosas geralmente é reportada com o uso da escala logarítmica do pH. O bicarbonato e outros tampões normalmente mantêm o pH do líquido extracelular entre 7,35 e 7,45. A suspeita de distúrbios do equilíbrio ácido-base é verificada por meio da medição do pH do sangue arterial e do conteúdo de CO_2 do sangue venoso. As causas de acidose (pH sanguíneo $< 7,35$) incluem a cetose diabética e a acidose lática. A alcalose (pH $> 7,45$) pode suceder ao vômito do conteúdo gástrico ácido.

A ÁGUA É UM SOLVENTE BIOLÓGICO IDEAL

As moléculas de água formam dipolos

Uma molécula de água é um tetraedro irregular, ligeiramente torcido, com o oxigênio em seu centro (**Figura 2-1**). Os dois hidrogênios e os elétrons não compartilhados dos dois orbitais sp^3-hibridizados ocupam os cantos do tetraedro. O ângulo de

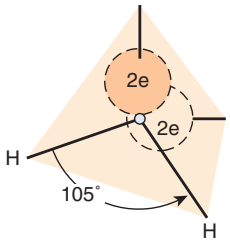


FIGURA 2-1 As moléculas de água apresentam geometria tetraédrica.

105° entre o hidrogênio difere um pouco do ângulo tetraédrico ideal, 109,5°. A amônia também é tetraédrica, com um ângulo de 107° entre seus hidrogênios. Os átomos de oxigênio fortemente eletronegativos na água atraem os elétrons para longe dos núcleos de hidrogênio, deixando-os com uma carga parcial positiva, enquanto seus dois pares de elétrons não compartilhados constituem uma região de carga local negativa.

Uma molécula com carga elétrica distribuída de maneira assimétrica ao redor de sua estrutura é referida como um **dipolo**. O dipolo forte da água é responsável por sua elevada **constante dielétrica**. Conforme descrito quantitativamente pela lei de Coulomb, a força de interação F entre partículas com cargas opostas é inversamente proporcional à constante dielétrica ε do meio circunvizinho. A constante dielétrica para um vácuo é 1; para o hexano, ela é 1,9; para o etanol, 24,3; e para a água, 78,5. Portanto, a água diminui muito a força de atração entre espécies carregadas e polares em relação aos ambientes sem água com constantes dielétricas menores. Seu dipolo forte e a constante dielétrica alta possibilitam que ela dissolva grandes quantidades de compostos carregados, como os sais.

As moléculas de água formam pontes de hidrogênio

Um núcleo de hidrogênio parcialmente desprotegido, ligado de modo covalente a um átomo de oxigênio ou nitrogênio captador de elétron, pode interagir com um par de elétron não compartilhado em outro átomo de oxigênio ou nitrogênio para formar uma **ponte de hidrogênio**. Como as moléculas de água contêm essas duas características, a ponte de hidrogênio favorece a auto-

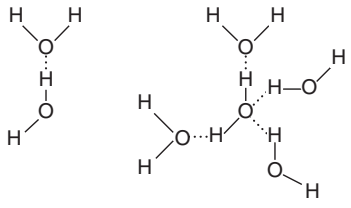


FIGURA 2-2 Esquerda: A associação por duas moléculas de água dipolares por uma ponte de hidrogênio (linha tracejada). **Direita:** Agrupamento de quatro moléculas de água ligadas por pontes de hidrogênio. Observe que a água pode servir simultaneamente tanto como doador de hidrogênio como aceptor de hidrogênio.

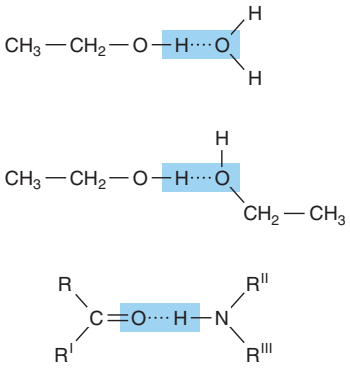


FIGURA 2-3 Os grupamentos polares adicionais participam na ponte de hidrogênio. São mostradas as pontes de hidrogênio formadas entre álcool e água, entre duas moléculas de etanol e entre o oxigênio da carbonila do peptídeo e o hidrogênio do nitrogênio do peptídeo de um aminoácido adjacente.

associação das moléculas de água em arranjos ordenados (**Figura 2-2**). A ponte de hidrogênio influencia profundamente as propriedades físicas de água e contribui para sua viscosidade excepcionalmente alta, tensão superficial e ponto de ebulição. Na média, cada molécula em água líquida se associa por meio de pontes de hidrogênio com 3,5 outras moléculas. Essas pontes são tanto relativamente fracas quanto transitórias, com uma meia-vida de alguns nanossegundos ou menos. A ruptura de uma ponte de hidrogênio em água líquida requer apenas cerca de 4,5 kcal/mol, menos de 5% da energia necessária para romper uma ligação O—H covalente.

As pontes de hidrogênio possibilitam que a água dissolva muitas biomoléculas orgânicas que contêm grupamentos funcionais que podem participar nas pontes de hidrogênio. Os átomos de oxigênio de aldeídos, cetonas e amidas, por exemplo, fornecem pares solitários de elétrons que podem servir como aceptores de hidrogênio. Alcoóis, ácidos carboxílicos e aminas podem servir tanto como aceptores de hidrogênio quanto como doadores de átomos de hidrogênio desprotegidos para a formação de pontes de hidrogênio (**Figura 2-3**).

A INTERAÇÃO COM A ÁGUA INFLUENCIA A ESTRUTURA DAS BIOMOLÉCULAS

Ligações covalentes e não covalentes estabilizam as moléculas biológicas

A ligação covalente é a força mais vigorosa que mantém as moléculas unidas (**Tabela 2-1**). As forças não covalentes, embora de menor magnitude, fazem contribuições significativas para a estrutura, estabilidade e competência funcional das macromoléculas nas células vivas. Essas forças, que tanto podem ser de atração quanto de repulsão, envolvem interações tanto dentro da biomolécula quanto entre ela e a água que forma o principal componente do ambiente adjacente.

TABELA 2-1 Energias de ligação para átomos de significado biológico

Tipo de ligação	Energia (kcal/mol)	Tipo de ligação	Energia (kcal/mol)
O–O	34	O=O	96
S–S	51	C–H	99
C–N	70	C=S	108
S–H	81	O–H	110
C–C	82	C=C	147
C–O	84	C=N	147
N–H	94	C–O	164

As biomoléculas se dobram para posicionar os grupamentos polares e carregados em suas superfícies

A maioria das biomoléculas são **anfipáticas**; isto é, possuem regiões ricas em grupamentos funcionais carregados ou polares, assim como regiões com caráter hidrofóbico. As proteínas tendem a se dobrar com os grupamentos R dos aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas no interior. Os aminoácidos com cadeias laterais de aminoácidos carregadas ou polares (p. ex., arginina, glutamato, serina) geralmente estão presentes na superfície em contato com a água. Um padrão similar prevalece em uma dupla camada fosfolipídica, onde os "grupamentos cabeça", carregados da fosfatidil serina ou fosfatidil etanolamina, fazem contato com a água, enquanto suas cadeias laterais hidrofóbicas de acilgraxo se agrupam, excluindo a água. Esse padrão maximiza as oportunidades para a formação de carga energeticamente favorável-dipolo-carga, dipolo-dipolo e de interações de pontes de hidrogênio entre os grupamentos polares na biomolécula e na água. Ele também minimiza os contatos energeticamente desfavoráveis entre a água e os grupamentos hidrofóbicos.

Interações hidrofóbicas

A interação hidrofóbica se refere à tendência dos compostos não polares para se autoassociar em um ambiente aquoso. Essa autoassociação não é dirigida por atração mútua, nem pelo que é por vezes referido de maneira incorreta como "ligações hidrofóbicas". A autoassociação minimiza a ruptura de interações energeticamente favoráveis entre moléculas de água adjacentes.

Embora os hidrogênios de grupamentos não polares, como os grupamentos metileno dos hidrocarbonetos, não formem pontes de hidrogênio, eles realmente afetam a estrutura da água que os circundam. As moléculas de água adjacentes a um grupamento hidrofóbico apresentam um número restrito de orientações (grau de liberdade) que permitem que elas participem no número máximo de pontes de hidrogênio energeticamente favoráveis. A formação máxima de múltiplas pontes de hidrogênio, o que maximiza a entalpia, pode ser mantida apenas ao se aumentar a ordem das moléculas de água adjacentes, com uma diminuição concomitante na entropia.

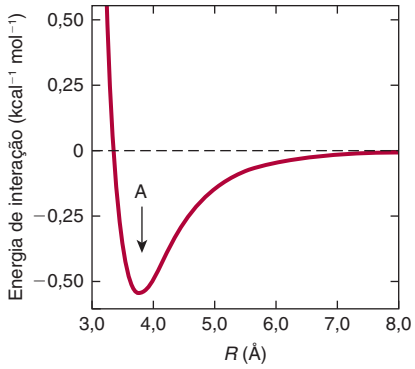


FIGURA 2-4 A força das interações de van der Waals varia com a distância, *R*, entre as espécies interatuantes. A força da interação entre as espécies interatuantes aumenta com a diminuição da distância até que elas estejam separadas pela distância de contato de van der Waals (ver a seta marcada com A). A repulsão decorrente da interação entre os elétrons de cada átomo ou molécula sobrevém em seguida. Embora as interações de van der Waals individuais sejam extremamente fracas, o efeito cumulativo contudo é substancial para as macromoléculas como o DNA e as proteínas com muitos átomos em contato próximo.

A segunda lei da termodinâmica diz que a energia livre ótima de uma mistura de hidrocarboneto e água é função tanto da entalpia máxima (a partir das pontes de hidrogênio) quanto da entropia mínima (graus máximos de liberdade). Dessa maneira, as moléculas não polares tendem a formar gotículas que minimizam a área de superfície exposta e a reduzir a quantidade de moléculas de água cuja liberdade de movimento se torna restrita. De modo similar, no ambiente aquoso da célula viva, as porções hidrofóbicas dos biopolímeros tendem a ficar dentro da estrutura da molécula ou dentro de uma dupla camada lipídica, minimizando o contato com a água.

Interações eletrostáticas

As interações entre grupamentos carregados ajudam a modelar a estrutura biomolecular. As interações eletrostáticas entre grupamentos carregados com cargas opostas dentro ou entre biomoléculas são denominadas **pontes salinas**. As pontes salinas são comparáveis em força às pontes de hidrogênio, mas agem sobre distâncias maiores. Por conseguinte, elas frequentemente facilitam a ligação de íons e moléculas carregadas com proteínas e ácidos nucleicos.

Forças de van der Waals

As forças de van der Waals se originam das atrações entre dipolos transitórios produzidos pelo movimento rápido dos elétrons de todos os átomos neutros. Muito mais fracas que as pontes de hidrogênio, porém potencialmente extremamente numerosas, as forças de van der Waals diminuem como a sexta potência da distância que separa os átomos (**Figura 2-4**). Assim, elas atuam sobre distâncias muito curtas, geralmente 2 a 4 angstrons.

As múltiplas forças estabilizam as biomoléculas

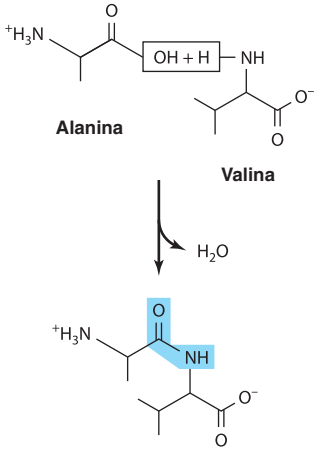
A dupla-hélice do DNA ilustra a contribuição das múltiplas forças para a estrutura das biomoléculas. Embora cada fita in-

dividual do DNA seja mantida unida por ligações covalentes, as duas fitas da hélice são mantidas juntas exclusivamente por interações não covalentes, como as pontes de hidrogênio entre as bases nucleotídicas (pareamento de bases de Watson-Crick) e as interações de van der Waals entre as bases purínicas e pirimidínicas empilhadas. A dupla-hélice apresenta grupamentos fosfato carregados e grupamentos hidroxila polares a partir de açúcares do tipo ribose da estrutura do DNA com a água, enquanto desloca para seu interior as bases nucleotídicas relativamente hidrofóbicas. A estrutura estendida maximiza a distância entre fosfatos carregados negativamente, minimizando as interações eletrostáticas desfavoráveis.

A ÁGUA É UM EXCELENTE NUCLEÓFILO

As reações metabólicas frequentemente envolvem o ataque por pares isolados de elétrons que residem em moléculas ricas em elétrons denominadas **nucleófilos** sobre átomos deficientes em elétrons chamados **eletrófilos**. Os nucleófilos e os eletrófilos não têm necessariamente uma carga negativa ou positiva formal. A água, cujos dois pares isolados de elétrons sp^3 comportam uma carga negativa parcial (Figura 2-1), é um excelente nucleófilo. Os outros nucleófilos de importância biológica incluem os átomos de oxigênio dos fosfatos, alcoóis e ácidos carboxílicos; o enxofre dos tióis, o nitrogênio das amidas e o anel imidazólico da histidina. Os eletrófilos comuns incluem os carbonos carbonila nas amidas, ésteres, aldeídos e cetonas e os átomos de fósforo dos fosfoésteres.

O ataque nucleofílico pela água resulta normalmente na clivagem das ligações amida, glicosídica ou éster que mantêm unidos os biopolímeros. Este processo é chamado de **hidrólise**. Em contrapartida, quando as unidades monoméricas são unidas para formar biopolímeros, como as proteínas ou glicogênio, a água é um produto, por exemplo, durante a formação de uma ligação peptídica entre dois aminoácidos:



Quando a hidrólise é uma reação favorecida do ponto de vista termodinâmico, as ligações amida e fosfoéster dos polipeptídios e oligonucleotídios são estáveis no meio aquoso da célula. Esse comportamento aparentemente paradoxal reflete o fato de que a termodinâmica que governa o equilíbrio de uma reação não determina a velocidade em que ela prosseguirá. Na célula, os catalisadores de proteína chamados **enzimas** aceleram a velocidade das reações hidrolíticas, quando necessário. As **proteases** catalisam a hidrólise de proteínas em seus aminoácidos componentes, enquanto as **nucleases** catalisam a hidrólise de ligações fosfoéster no DNA e no RNA.O controle cuidadoso das atividades dessas enzimas é necessário para garantir que elas atuem apenas sobre as moléculas-alvo apropriadas nos momentos apropriados.

Muitas reações metabólicas envolvem a transferência do grupamento

Muitas das reações enzimáticas responsáveis pela síntese e clivagem de biomoléculas envolvem a transferência de um grupamento químico G de um doador D para um aceptor A, de modo a formar um grupamento aceptor complexo, A−G:

$$D{-}G + A \rightleftarrows A{-}G + D$$

A hidrólise e a fosforólise do glicogênio, por exemplo, envolvem a transferência de grupamentos glicosila para a água ou para o ortofosfato. A constante de equilíbrio para a hidrólise de ligações covalentes favorece fortemente a formação de produtos de clivagem. Em contrapartida, em muitos casos, as reações de transferência de grupamento responsáveis pela biossíntese das macromoléculas envolvem a formação de ligações covalentes desfavorecidas do ponto de vista termodinâmico. As enzimas catalisadoras desempenham um papel primordial na superação dessas barreiras em virtude de sua capacidade de unir diretamente duas reações normalmente distintas. Ao acoplar uma reação de transferência de grupamento energeticamente desfavorável a uma reação termodinamicamente favorável, como a hidrólise do ATP, uma nova reação acoplada pode ser gerada, cuja alteração *global* conjunta na energia livre favorece a síntese do biopolímero.

Diante do caráter nucleofílico da água e da sua alta concentração nas células, por que biopolímeros como as proteínas e o DNA são relativamente estáveis? Como a síntese de biopolímeros pode acontecer em um ambiente aquoso, aparentemente pró-hidrolítico? No centro dessas questões estão as propriedades das enzimas. Na ausência de catalisadores enzimáticos, mesmo as reações que são altamente favorecidas do ponto de vista termodinâmico não ocorrem necessariamente de maneira rápida. O controle exato e diferencial da atividade enzimática e o sequestro das enzimas em organelas específicas determinam sob quais condições fisiológicas um determinado biopolímero será sintetizado ou degradado. Os biopolímeros recentemente sintetizados não são imediatamente hidrolisados, pois os sítios ativos das enzimas biossintéticas sequestram os substratos em um ambiente, a partir do qual a água pode ser excluída.

As moléculas de água exibem uma tendência discreta, porém importante, para se dissociar

A capacidade da água para ionizar, embora discreta, é de importância central para a vida. Como a água pode atuar tanto como ácido como base, sua ionização pode ser representada como uma transferência de próton intermolecular que forma um íon hidrônio (H_3O^+) e um íon hidróxido (OH^-):

$$H_2O + H_2O \rightleftarrows H_3O^+ + OH^-$$

O próton transferido está associado, na realidade, a um agrupamento de moléculas de água. Os prótons existem em solução

não somente como H_3O^+, mas também como multímeros como $H_5O_2^+$ e $H_7O_3^+$. Apesar disso, o próton é rotineiramente representado como H^+, ainda que ele, na realidade, esteja altamente hidratado.

Como os íons hidrônio e hidróxido se recombinam continuamente para formar moléculas de água, não se pode dizer que um hidrogênio ou oxigênio *individual* está presente como um íon ou como parte de uma molécula de água. Em um instante, ele é um íon; um instante depois, ele é parte de uma molécula de água. Portanto, íons ou moléculas individuais não são considerados. Em vez disso, refere-se à *probabilidade* de que, em um instante qualquer no tempo, um determinado hidrogênio estará presente como um íon ou como parte de uma molécula de água. Como 1 g de água contém $3{,}46 \times 10^{22}$ moléculas, a ionização da água pode ser descrita por meios estatísticos. Dizer que a probabilidade de que um hidrogênio seja como um íon é de 0,01 significa que, em um determinado momento no tempo, um átomo de hidrogênio apresenta 1 chance em 100 de ser um íon, e 99 chances em 100 de ser parte de uma molécula de água. A probabilidade real de um átomo de hidrogênio em água pura existir como um íon hidrogênio é de aproximadamente $1{,}8 \times 10^{-9}$. A probabilidade de ele ser parte de uma molécula de água é, assim, quase 100%. Dito de outra maneira, para cada íon de hidrogênio ou íon hidróxido em água pura, existe 1,8 bilhão ou $1{,}8 \times 10^9$ moléculas de água. Entretanto, os íons hidrogênio e os íons hidróxido contribuem significativamente para as propriedades da água.

Para a dissociação da água,

$$K = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}$$

onde as chaves representam as concentrações molares (falando de forma estrita, as atividades molares) e K é a **constante de dissociação**. Como 1 mol de água pesa 18 g, um litro (L) (1000 g) de água contém 1000 / 18 = 55,56 mol. Desta maneira, a água pura é 55,56 molar. Como a probabilidade de que um íon hidrogênio na água pura exista como um íon hidrogênio é de $1{,}8 \times 10^{-9}$, a concentração molar de íons H^+ (ou dos íons OH^-) na água pura é o produto da probabilidade, $1{,}8 \times 10^{-9}$, vezes a concentração molar da água, 55,6 mol/L.O resultado é $1{,}0 \times 10^{-7}$ mol/L.

Calcula-se agora a K para a água pura:

$$K = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]} = \frac{[10^{-7}][10^{-7}]}{[55{,}56]}$$
$$= 0{,}018 \times 10^{-14} = 1{,}8 \times 10^{-16}\,\text{mol/L}$$

A concentração molar da água, 55,56 mol/L, é muito grande para ser afetada de forma significativa pela dissociação. Portanto, considera-se que ela é essencialmente constante. Essa constante pode, por conseguinte, ser incorporada na constante de dissociação K para fornecer uma nova constante K_a útil denominada de **produto iônico** para a água. A relação entre K_a e K é mostrada abaixo:

$$K = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]} = 1{,}8 \times 10^{-16}\,\text{mol/L}$$
$$K_a = (K)[H_2O] = [H^+][OH^-]$$
$$= (1{,}8 \times 10^{-16}\,\text{mol/L})(55{,}56\,\text{mol/L})$$
$$= 1{,}00 \times 10^{-14}\,(\text{mol/L})^2$$

Observe que as dimensões de K são mols por litro, e aquelas de K_a são mols^2 por litro^2. Como seu nome sugere, o produto iônico K_a é numericamente igual ao produto das concentrações molares de H^+ e OH^-:

$$K_a = [H^+][OH^-]$$

A 25º C, $K_a = (10^{-7})^2$, ou 10^{-14} (mol/L)^2. Em temperaturas abaixo de 25º C, K_a é um pouco inferior a 10^{-14}, sendo que, em temperaturas acima de 25º C, ele é algo superior a 10^{-14}. Dentro das limitações definidas do efeito da temperatura, K_a é igual a 10^{-14} (mol/L)^2 para todas as soluções aquosas, mesmo soluções de ácidos ou bases. Utiliza-se K_a para calcular o pH de soluções ácidas e básicas.

O pH É O LOG NEGATIVO DA CONCENTRAÇÃO DO ÍON HIDROGÊNIO

O termo **pH** foi introduzido em 1909 por Sörensen, que definiu o pH como o logaritmo negativo da concentração do íon hidrogênio:

$$pH = -\log [H^+]$$

Essa definição, embora não rigorosa, é suficiente para muitos propósitos bioquímicos. Para calcular o pH de uma solução:

1. Calcule a concentração do íon hidrogênio $[H^+]$.
2. Calcule o logaritmo em base 10 de $[H^+]$.
3. O pH é o negativo do valor encontrado na etapa 2.

Por exemplo, para a água pura a 25º C,

$$pH = -\log [H^+] = -\log 10^{-7} = -(-7) = 7{,}0$$

Este valor também é conhecido como *power* (inglês), *puissant* (francês), *Potenz* (alemão) ou *potência* do expoente, daí o uso do termo "p".

Os valores de pH baixos correspondem a altas concentrações de H^+ e os valores altos do pH correspondem a concentrações baixas de H^+.

Os ácidos são **doadores de próton** e as bases são **aceptores de próton**. Os **ácidos fortes** (p. ex., HCl, H_2SO_4) dissociam-se totalmente em ânions e prótons mesmos em soluções fortemente ácidas (pH baixo). Os **ácidos fracos** dissociam-se apenas de maneira parcial nas soluções ácidas. De modo similar, as **bases fortes** (p. ex., KOH, NaOH) – mas não as **bases fracas**, p. ex.: $Ca(OH)_2$, estão completamente dissociadas mesmo em pH alto. Muitas substâncias bioquímicas são ácidos fracos. As exceções incluem os intermediários fosforilados, cujo grupamento fosforil contém dois prótons dissociáveis, dos quais o primeiro é fortemente ácido.

Os exemplos a seguir ilustram o modo de calcular o pH de soluções ácidas e básicas.

Exemplo 1: Qual é o pH de uma solução cuja concentração de íon hidrogênio é $3{,}2 \times 10^{-4}$ mol/L?

$$pH = -\log [H^+]$$
$$= -\log (3{,}2 \times 10^{-4})$$
$$= -\log (3{,}2) - \log (10^{-4})$$
$$= -0{,}5 + 4{,}0$$
$$= 3{,}5$$

Exemplo 2: Qual é o pH de uma solução cuja concentração de íon hidróxido é de $4{,}0 \times 10^{-4}$ mol/L? Primeiramente, define-se que uma quantidade de **pOH** que é igual ao $-\log [OH^-]$ e que pode ser derivada da definição de K_a:

$$K_a = [H^+][OH^-] = 10^{-14}$$

Portanto,

$$\log [H^+] + \log [OH^-] = \log 10^{-14}$$

ou

$$pH + pOH = 14$$

Solucionando o problema por esta conduta:

$$\begin{aligned} [OH^-] &= 4{,}0 \times 10^{-4} \\ pOH &= -\log [OH^-] \\ &= -\log (4{,}0 \times 10^{-4}) \\ &= -\log (4{,}0) - \log (10^{-4}) \\ &= -0{,}60 + 4{,}0 \\ &= 3{,}4 \end{aligned}$$

Agora

$$\begin{aligned} pH &= 14 - pOH = 14 - 3{,}4 \\ &= 10{,}6 \end{aligned}$$

Os exemplos acima ilustram como a escala de pH logarítmica facilita o registro e a comparação das concentrações de íon hidrogênio que diferem por ordens de magnitude entre si, i.e., 0,00032 M (pH 3,5) e 0,000000000025 (pH 10,6).

Exemplo 3: Quais são os valores de pH de (a) $2{,}0 \times 10^{-2}$ mol/L de KOH e de (b) $2{,}0 \times 10^{-6}$ mol/L de KOH? O OH^- se origina de duas fontes, KOH e água. Como o pH é determinado pela $[H^+]$ total (e o pOH pela $[OH^-]$ total), ambas as fontes devem ser consideradas. No primeiro caso (a), a contribuição da água para a $[OH^-]$ total é desprezível. O mesmo não pode ser dito para o segundo caso (b):

	Concentração (mol/L)	
	(a)	(b)
Molaridade do KOH	$2{,}0 \times 10^{-2}$	$2{,}0 \times 10^{-6}$
$[OH^-]$ de KOH	$2{,}0 \times 10^{-2}$	$2{,}0 \times 10^{-6}$
$[OH^-]$ da água	$1{,}0 \times 10^{-7}$	$1{,}0 \times 10^{-7}$
Total $[OH^-]$	$2{,}00001 \times 10^{-2}$	$2{,}1 \times 10^{-6}$

Uma vez alcançada uma decisão sobre o significado da contribuição pela água, o pH pode ser calculado conforme mostrado acima.

Os exemplos anteriores supõem que a base forte KOH está totalmente dissociada na solução, e que a concentração dos íons OH^- era, desta maneira, igual àquela decorrente do KOH mais aquela presente inicialmente na água. Esta suposição é válida para soluções diluídas de ácidos ou bases fortes, mas não para ácidos ou bases fracas. Como os eletrólitos fracos se dissociam apenas discretamente em solução, deve-se utilizar a **constante de dissociação** para calcular a concentração do $[H^+]$ (ou $[OH^-]$) produzida por uma determinada molaridade de um ácido (ou base) fraco antes de calcular a $[H^+]$ total (ou a $[OH^-]$ total) e, subsequentemente, o pH.

Os grupamentos funcionais que são ácidos fracos apresentam grande significado fisiológico

Muitas substâncias bioquímicas possuem grupamentos funcionais que são ácidos ou bases fracas. Os grupamentos carboxila, os grupamentos amino e os ésteres de fosfato, cuja segunda dissociação cai dentro da faixa fisiológica, estão presentes nas proteínas e nos ácidos nucleicos, na maioria das coenzimas e na maioria dos metabólitos intermediários. O conhecimento da dissociação de ácidos e bases fracas é, desta forma, básico para a compreensão da influência do pH intracelular sobre a estrutura e atividade biológica. As separações baseadas na carga, como a eletroforese e a cromatografia de troca iônica, também são mais bem compreendidas em termos do comportamento de dissociação dos grupamentos funcionais.

São chamados de espécies protonadas (p. ex., HA ou $R—NH_3^+$) **o ácido** e de espécies não protonadas (p. ex., A^- ou $R—NH_2$) sua **base conjugada**. De maneira similar, pode-se referir a uma **base** (p. ex., A^- ou $R—NH_2$) e seu **ácido conjugado** (p. ex., HA ou $R—NH_3^+$). Os ácidos fracos representativos (à esquerda), suas bases conjugadas (centro) e os valores do pK_a (direita) incluem as seguintes:

$R—CH_2—COOH$	$R—CH_2—COO^-$	$pK_a = 4 - 5$
$R—CH_2—NH_3^+$	$R—CH_2—NH_2$	$pK_a = 9 - 10$
H_2CO_3	HCO_3^-	$pK_a = 6{,}4$
$H_2PO_4^-$	HPO_4^{-2}	$pK_a = 7{,}2$

Expressa-se as forças relativas dos ácidos e bases fracas em termos de suas constantes de dissociação. Adiante estão mostradas as expressões da constante de dissociação (K_a) para dois ácidos fracos representativos, $R—COOH$ e $R—NH_3^+$.

$$R—COOH \rightleftarrows R—COO^- + H^+$$

$$K_a = \frac{[R—COO^-][H^+]}{[R—COOH]}$$

$$R—NH_3^+ \rightleftarrows R—NH_2 + H^+$$

$$K_a = \frac{[R—NH_2][H^+]}{[R—NH_3^+]}$$

Como os valores numéricos da K_a para os ácidos fracos são números exponenciais negativos, a K_a é expressa como pK_a, onde

$$pK_a = -\log K_a$$

Observe que a pK_a está relacionada com a K_a assim como o pH está como $[H^+]$. Quanto mais forte for o ácido, mais baixo é o valor de seu pK_a.

O pK_a é usado para expressar as forças relativas de ácidos e bases. Para qualquer ácido fraco, seu conjugado é uma base forte. De maneira similar, o conjugado de uma base forte é um ácido fraco. **As forças relativas das bases são expressas em termos do pK_a de seus ácidos conjugados**. Para compostos polipróticos contendo mais de um próton dissociável, um número subscrito é atribuído a cada dissociação, com a numeração começando da unidade em ordem decrescente da acidez relativa. Para uma dissociação do tipo

$$R—NH_3^+ \rightarrow R—NH_2 + H^+$$

a pK_a é o pH em que a concentração do ácido $R—NH_3^+$ iguala-se àquela da base $R—NH_2$.

A partir das equações acima que relacionam K_a a $[H^+]$ e às concentrações do ácido não dissociado e de sua base conjugada, quando

$$[R—COO^-] = [R—COOH]$$

ou quando

$$[R—NH_2] = [R—NH_3^+]$$

então

$$K_a = [H^+]$$

Desta maneira, quando as espécies associadas (protonadas) e dissociadas (base conjugada) estão presentes em concentrações iguais, a concentração de íon hidrogênio $[H^+]$ prevalente é numericamente igual à constante de dissociação, K_a. Quando os logaritmos de ambos os lados da equação acima são considerados, e ambos os lados são multiplicados por −1, as expressões seriam as seguintes:

$$K_a = [H^+]$$
$$-\log K_a = -\log[H^+]$$

Como $-\log K_a$ é definido como pK_a, e $-\log [H^+]$ define o pH, a equação pode ser reescrita como

$$pK_a = pH$$

isto é, **o pK_a de um grupamento ácido é o pH em que as espécies protonadas e não protonadas estão presentes em concentrações iguais.** O pK_a para um ácido pode ser determinado ao se acrescentar 0,5 equivalente de álcali por equivalente de ácido. O pH resultante será igual ao pK_a do ácido.

A equação de Henderson-Hasselbach descreve o comportamento de ácidos fracos e tampões

A equação de Henderson-Hasselbach é derivada abaixo.

Um ácido fraco, HA, ioniza da seguinte maneira:

$$HA \rightleftarrows H^+ + A^-$$

A constante de equilíbrio para esta dissociação é

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

A multiplicação cruzada fornece

$$[H^+][A^-] = K_a[HA]$$

Divide-se ambos os lados por $[A^-]$:

$$[H^+] = k_a \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Obtém-se o log de ambos os lados:

$$\log [H^+] = \log \left(K_a \frac{[HA]}{[A^-]} \right)$$

$$= \log K_a + \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Multiplica-se por −1:

$$-\log [H^+] = -\log K_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Substitui-se pH e pK_a por $-\log [H^+]$ e $-\log K_a$, respectivamente; então

$$pH = pK_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

A inversão do último termo remove o sinal negativo e origina a **equação de Henderson-Hasselbach**

$$\mathbf{pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}}$$

A equação de Henderson-Hasselbach tem grande valor preditivo nos equilíbrios protônicos. Por exemplo,

1. Quando um ácido é neutralizado exatamente pela metade, $[A^-] = [HA]$. Sob estas condições,

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} = pK_a + \log \left(\frac{1}{1} \right) = pK_a + 0$$

Portanto, na neutralização pela metade, $pH = pK_a$.

2. Quando a proporção $[A^-]/[HA] = 100{:}1$,

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$
$$pH = pK_a + \log (100/1) = pK_a + 2$$

3. Quando a proporção $[A^-]/[HA] = 1{:}10$,

$$pH = pK_a + \log (1/10) = pK_a + (-1)$$

Quando a equação é avaliada nas proporções de $[A^-]/[HA]$ variando de 10^3 a 10^{-3} e os valores do pH calculados são plotados, o gráfico resultante descreve a curva de titulação para um ácido fraco (**Figura 2-5**).

Soluções de ácidos fracos e seus sais tamponam as alterações no pH

As soluções de bases ou ácidos fracos e seus conjugados exibem **tamponamento**, a capacidade de resistir a uma alteração no pH após a adição de base ou ácido forte. Como muitas reações metabólicas são acompanhadas pela liberação ou captação de prótons, muitas reações intracelulares são tamponadas. O metabolismo oxidativo produz CO_2, o anidrido do ácido carbônico que, se não fosse tamponado, produziria acidose grave. A manutenção de um pH constante envolve o tamponamento por fosfato, bicarbonato e proteínas, que aceitam ou liberam prótons para resistir a uma mudança no pH. Para experimentos que empregam extratos teciduais ou enzimas, o pH constante é mantido por meio da adição de tampões como o MES (ácido [2-*N*-morfolino]-etanossulfônico, pK_a 6,1), ortofosfato inorgânico (pK_{a2} 7,2), HEPES (ácido *N*-hidroxietilpiperazina, *N*′-2-etanossulfônico, pK_a 6,8) ou Tris (tri[hidroximetil]aminometano, pK_a 8,3).O valor do pK_a relativo ao pH desejado é o principal determinante de qual tampão é selecionado.

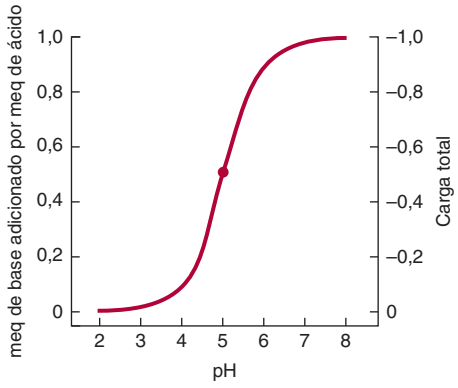


FIGURA 2-5 Curva de titulação para um ácido do tipo HA. O ponto no centro da curva indica o pK_a 5,0.

O tamponamento pode ser observado ao se usar um medidor de pH durante a titulação de uma base ou ácido fraco (**Figura 2-5**). Também pode-se calcular a variação do pH que acompanha a adição de ácido ou base a uma solução tamponada. No exemplo, a solução tamponada (um ácido fraco, pK_a =5,0, e sua base conjugada) esta, a princípio, em um dos quatro valores do pH. Calcula-se a variação do pH que resulta quando 0,1 meq do KOH é adicionado a 1 meq de cada solução:

pH inicial	5,00	5,37	5,60	5,86
$[A^-]_{inicial}$	0,50	0,70	0,80	0,88
$[HA]_{inicial}$	0,50	0,30	0,20	0,12
$([A^-]/[HA])_{inicial}$	1,00	2,33	4,00	7,33
Adição de 0,1 meq de KOH produz				
$[A^-]_{final}$	0,60	0,80	0,90	0,98
$[HA]_{final}$	0,40	0,20	0,10	0,02
$([A^-]/[HA])_{final}$	1,50	4,00	9,00	49,0
$\log([A^-]/[HA])_{final}$	0,18	0,60	0,95	1,69
pH final	5,18	5,60	5,95	6,69
ΔpH	**0,18**	**0,60**	**0,95**	**1,69**

Observe que a alteração no pH por miliequivalente do OH^- adicionado depende do pH inicial. A solução resiste a alterações no pH de modo mais efetivo em valores de pH próximos ao pK_a. **Uma solução de um ácido fraco e sua base conjugada tamponam de maneira mais efetiva o pH na faixa de pK_a ± 1,0 unidade de pH**.

A Figura 2-5 também ilustra a carga global sobre uma molécula do ácido como função do pH. Uma carga fracionada de −0,5 não significa que uma molécula individual comporte uma carga fracionada, mas que a *probabilidade* é de 0,5 que uma determinada molécula tenha uma unidade de carga negativa em determinado momento qualquer no tempo. A consideração da carga global sobre as macromoléculas como função do pH proporciona a base para as técnicas de separação como a cromatografia de troca iônica e a eletroforese.

TABELA 2-2 Forças relativas de ácidos selecionados de significado biológico[1]

Ácidos monopróticos		
Fórmico	pK	3,75
Lático	pK	3,86
Acético	pK	4,76
Íon amônio	pK	9,25
Ácidos dipróticos		
Carbônico	pK_1	6,37
	pK_2	10,25
Succínico	pK_1	4,21
	pK_2	5,64
Glutárico	pK_1	4,34
	pK_2	5,41
Ácidos tripróticos		
Fosfórico	pK_1	2,15
	pK_2	6,82
	pK_3	12,38
Cítrico	pK_1	3,08
	pK_2	4,74
	pK_3	5,40

[1]**Nota**: Os valores tabulados são os valores de pk_a (−log da constante de dissociação) de ácidos monopróticos, dipróticos e tripróticos selecionados.

A força do ácido depende da estrutura molecular

Muitos ácidos de interesse biológico possuem mais de um grupamento de dissociação. A presença da carga negativa adjacente dificulta a liberação de um próton a partir de um grupamento próximo, elevando seu pK_a. Isso fica aparente a partir dos valores do pK_a para três grupamentos de dissociação do ácido fosfórico e do ácido cítrico (**Tabela 2-2**). O efeito da carga adjacente diminui com a distância. O segundo pK_a para o ácido succínico, que possui dois grupamentos metileno entre seus grupamentos carboxila, é 5,6, enquanto o segundo pK_a para o ácido glutárico, que possui um grupamento metileno adicional, é de 5,4.

Os valores do pK_a dependem das propriedades do meio

O pK_a de um grupamento funcional também é profundamente influenciado pelo meio adjacente. O meio pode tanto elevar

quanto diminui o pK_a, dependendo de se o ácido não dissociado ou sua base conjugada é a espécie carregada. O efeito da constante dielétrica sobre o pK_a pode ser observado ao se adicionar etanol à água. O pK_a de um ácido carboxílico *aumenta*, enquanto aquela de uma amina *diminui* porque o etanol reduz a capacidade da água para solvatar uma espécie carregada. Os valores do pK_a dos grupamentos de dissociação nos interiores das proteínas são, desta maneira, profundamente afetados por seu ambiente local, incluindo a presença ou ausência de água.

RESUMO

- A água forma agrupamentos ligados por pontes de hidrogênio entre eles mesmos e com outros doadores ou aceptores de próton. As pontes de hidrogênio contribuem para a tensão superficial, viscosidade, estado líquido na temperatura ambiente e poder solvente da água.
- Os compostos que contêm O ou N podem servir como doadores e/ou aceptores de ponte de hidrogênio.
- As macromoléculas trocam as pontes de hidrogênio na superfície interna por pontes de hidrogênio com a água. As forças entrópicas ditam que as macromoléculas expõem as regiões polares a uma interface aquosa e aprofundam as regiões não polares.
- Pontes salinas, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals participam na manutenção da estrutura molecular.
- O pH é o log negativo da $[H^+]$. Um pH baixo caracteriza uma solução ácida e um pH alto denota uma solução básica.
- A força de ácidos fracos é expressa por pK_a, o log negativo da constante de dissociação do ácido. Os ácidos fortes apresentam valores de pK_a baixos e os ácidos fracos possuem valores de pK_a altos.
- Os tampões resistem a uma alteração no pH quando os prótons são produzidos ou consumidos. A capacidade de tamponamento máxima ocorre $\pm$ 1 unidade de pH em ambos os lados da pK_a. Os tampões fisiológicos incluem bicarbonato, ortofosfato e proteínas.

REFERÊNCIAS

Reese KM: Whence came the symbol pH. Chem & Eng News 2004;82:64.

Segel IM: *Biochemical Calculations*. Wiley, 1968.

Skinner JL: Following the motions of water molecules in aqueous solutions. Science 2010;328:985.

Stillinger FH: Water revisited. Science 1980;209:451.

Suresh SJ, Naik VM: Hydrogen bond thermodynamic properties of water from dielectric constant data. J Chem Phys 2000;113:9727.

Wiggins PM: Role of water in some biological processes. Microbiol Rev 1990;54:432.

SEÇÃO

I

Estruturas e Funções de Proteínas e Enzimas

CAPÍTULO

3

Aminoácidos e Peptídeos

Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Nomear e desenhar as estruturas dos 20 aminoácidos presentes nas proteínas.
- Escrever as designações de três e uma letra para cada um dos aminoácidos comuns.
- Listar os grupamentos ionizáveis dos aminoácidos comuns e seus valores de pK_a.
- Calcular o pH de uma solução aquosa não tamponada de um aminoácido polifuncional e a mudança no pH que ocorre após a adição de uma determinada quantidade de ácido ou base forte.
- Definir pI e indicar sua relação com a carga total em um eletrólito polifuncional.
- Explicar como o pH, o pK_a e o pI podem ser utilizados para predizer a mobilidade de um polieletrólito, como um aminoácido, em um campo elétrico de corrente direta.
- Descrever a contribuição de cada tipo de grupamento R dos aminoácidos comuns para suas propriedades químicas.
- Descrever a direcionalidade, a nomenclatura e a estrutura primária dos peptídeos.
- Identificar a ligação em um peptídeo que exibe o caráter de dupla ligação parcial e suas consequências de conformação em um peptídeo.
- Identificar aquelas ligações na estrutura do peptídeo que são capazes de livre rotação e as letras gregas usadas para designá-las.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Além de fornecer as unidades de monômero a partir das quais são sintetizadas as longas cadeias polipeptídicas das proteínas, os L-α-aminoácidos e seus derivados participam em funções celulares diversas, como a transmissão nervosa e a biossíntese de porfirinas, purinas, pirimidinas e ureia. Os polímeros curtos de aminoácidos chamados *peptídeos* desempenham papéis proeminentes no sistema neuroendócrino como hormônios, fatores de liberação de hormônios, neuromoduladores ou neurotransmissores. Os seres humanos e outros animais superiores carecem da capacidade de sintetizar 10 dos 20 L-α-aminoácidos comuns em quantidades adequadas para sustentar o crescimento do lactente ou para manter a saúde nos adultos. Em consequência, a dieta humana deve conter as quantidades adequadas desses aminoácidos nutricionalmente essenciais. Embora as proteínas humanas contenham apenas L-α-aminoácidos, os microrganismos fazem uso extenso de D-α-aminoácidos. O *Bacillus subtilis*, por exemplo, secreta uma mistura de D-metionina, D-tirosina, D-leucina e D-triptofano para deflagrar a desmontagem do biofilme, sendo que o *Vibrio cholerae* incorpora a D-leucina e a D-metionina no componente peptídico de sua camada de peptideoglicano. Muitas bactérias produzem peptídeos que contêm tanto D- quanto L-α-aminoácidos, dos quais vários

possuem valor terapêutico, incluindo os antibióticos bacitracina e gramicidina A e o agente antitumoral bleomicina. Outros determinados peptídeos microbianos são tóxicos. Os peptídeos microcistina e nodularina das cianobactérias são letais em grandes doses, enquanto pequenas quantidades promovem a formação de tumores hepáticos.

PROPRIEDADES DOS AMINOÁCIDOS

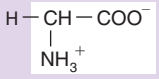
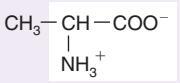
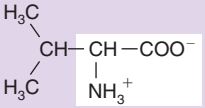
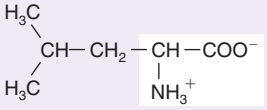
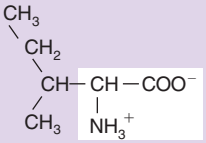
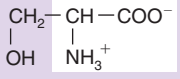
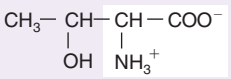
O código genético especifica 20 L-α-aminácidos

Dentre os mais de 300 aminoácidos de ocorrência natural, vinte constituem as unidades monoméricas predominantes das proteínas. Embora um código genético de três letras pudesse potencialmente acomodar mais de 20 aminoácidos, diversos aminoácidos são especificados por múltiplos códons (ver Tabela 37-1). O uso redundante limita os códons disponíveis aos 20 L-α-aminoácidos listados na **Tabela 3-1**. As abreviaturas de uma e três letras para cada aminoácido podem ser utilizadas para representar os aminoácidos nos peptídeos e nas proteínas (Tabela 3-1). Algumas proteínas contêm aminoácidos adicionais que se originam por meio da modificação de um aminoácido já presente em um peptídeo. Os exemplos incluem a conversão do peptidil prolina e lisina em 4-hidroxiprolina e 5-hidroxilisina; a conversão do peptidil glutamato em γ-carboxiglutamato; e a metilação, formilação, acetilação, prenilação e fosforilação de determinados resíduos aminoacil. Essas modificações estendem a diversidade biológica das proteínas ao alterar sua solubilidade, estabilidade e interação com outras proteínas.

Selenocisteína, o 21º L-α-aminoácido

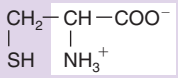
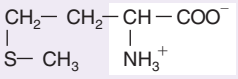
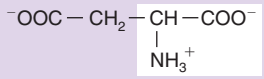
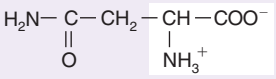
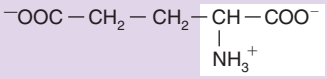
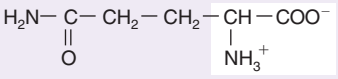
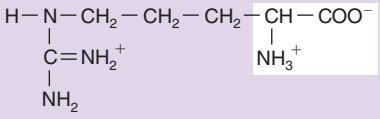
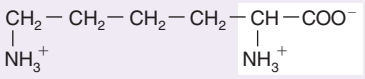
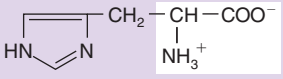
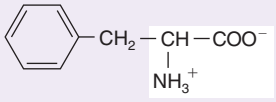
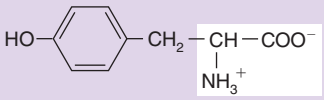
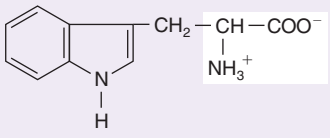
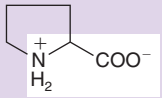
A selenocisteína é um L-α-aminoácido encontrado nas proteínas originárias de todos os domínios da vida. Os seres humanos contêm aproximadamente duas dúzias de selenoproteínas, que incluem determinadas peroxidases e redutases, a selenoproteína P que circula no plasma, e as iodotironina deiodinases responsáveis por converter o pró-hormônio tiroxina (T4) no hormônio tireóideo 3,3′5-triiodotironina (T3) (Capítulo 41). Conforme o nome sugere, um átomo de selênio substitui o enxofre de seu análogo

TABELA 3-1 L-α-aminoácidos presentes nas proteínas

Nome	Símbolo	Fórmula estrutural	pK_1	pK_2	pK_3
Com cadeias laterais alifáticas			**α-COOH**	**α-NH_3^+**	**Grupamento R**
Glicina	Gly (G)		2,4	9,8	
Alanina	Ala (A)		2,4	9,9	
Valina	Val (V)		2,2	9,7	
Leucina	Leu (L)		2,3	9,7	
Isoleucina	Ile (I)		2,3	9,8	
Com cadeias laterais contendo grupamentos hidroxílicos (OH)					
Serina	Ser (S)		2,2	9,2	Cerca de 13
Treonina	Thr (T)		2,1	9,1	Cerca de 13
Tirosina	Tyr (Y)	Ver adiante.			

(continua)

TABELA 3-1 L-α-aminoácidos presentes nas proteínas *(continuação)*

Nome	Símbolo	Fórmula estrutural	pK_1	pK_2	pK_3
Com cadeias laterais contendo átomos de enxofre			**α-COOH**	**α-NH_3^+**	**Grupamento R**
Cisteína	Cys (C)		1,9	10,8	8,3
Metionina	Met (M)		2,1	9,3	
Com cadeias laterais contendo grupamentos ácidos ou suas amidas					
Ácido aspártico	Asp (D)		2,1	9,9	3,9
Asparagina	Asn (N)		2,1	8,8	
Ácido glutâmico	Glu (E)		2,1	9,5	4,1
Glutamina	Gln (Q)		2,2	9,1	
Com cadeias laterais contendo grupamentos básicos					
Arginina	Arg (R)		1,8	9,0	12,5
Lisina	Lys (K)		2,2	9,2	10,8
Histidina	His (H)		1,8	9,3	6,0
Contendo anéis aromáticos					
Histidina	His (H)	Ver acima.			
Fenilalanina	Phe (F)		2,2	9,2	
Tirosina	Tyr (Y)		2,2	9,1	10,1
Triptofano	Trp (W)		2,4	9,4	
Iminoácido					
Prolina	Pro (P)		2,0	10,6	

estrutural, a cisteína. O pK_3 da selenocisteína, 5,2, é três unidades menor que o da cisteína. Diferente de outros aminoácidos incomuns, a selenocisteína não é o produto de uma modificação pós-tradução. Em vez disso, ela é inserida diretamente em um polipeptídeo em crescimento durante a tradução. Desta maneira, a selenocisteína é comumente referida como o "21º aminoácido". Contudo, diferente dos outros 20 aminoácidos geneticamente codificados, a selenocisteína é especificada por um elemento genético muito maior e mais complexo que o códon de três letras básico (ver Capítulo 27).

Somente os L-α-aminoácidos ocorrem nas proteínas

Com a única exceção da glicina, o carbono α de todo aminoácido é quiral. Embora alguns aminoácidos de proteína sejam dextrorrotatórios e alguns sejam levorrotatórios, todos compartilham a configuração absoluta do L-glutaraldeído e, assim, são definidos como L-α-aminoácidos. Vários L-α-aminoácidos executam papéis importantes nos processos metabólicos. Os exemplos incluem a ornitina, citrulina e argininossuccinato, que participam na síntese da ureia, a tirosina na formação dos hormônios tireóideos, e o glutamato na biossíntese de neurotransmissores. Os D-aminoácidos que ocorrem naturalmente incluem a D-serina e o D-aspartato livres no tecido cerebral, a D-alanina e o D-glutamato nas paredes celulares de bactérias gram-positivas, e os D-aminoácidos em determinados peptídeos e antibióticos produzidos por bactérias, fungos, répteis e outras espécies não mamíferas.

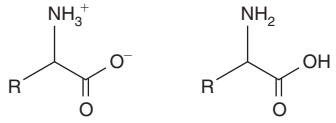
Os aminoácidos podem ter carga total positiva, negativa ou zero

As formas carregada e não carregada dos grupamentos ácido fraco —COOH e —NH_3^+ ionizáveis que existem em solução em equilíbrio protônico:

$$R{-}COOH \rightleftarrows R{-}COO^- + H^+$$
$$R{-}NH_3^+ \rightleftarrows R{-}NH_2 + H^+$$

Embora tanto o R—COOH quanto o R—NH_3^+ sejam ácidos fracos, o R—COOH é muito mais forte que o R—NH_3^+. Assim, em pH fisiológico (7,4), os grupamentos carboxila existem quase totalmente como R—COO^-, e grupamentos amino predominantemente como R—NH_3^+. A **Figura 3-1** ilustra o efeito do pH sobre o estado carregado do ácido aspártico.

As moléculas que contêm um número igual de grupamentos ionizáveis de carga oposta e que, por conseguinte, não comportam nenhuma carga *global*, são denominadas "**zwitterions**". Os aminoácidos no sangue e na maioria dos tecidos devem ser assim representados como em **A**, abaixo.



A **B**

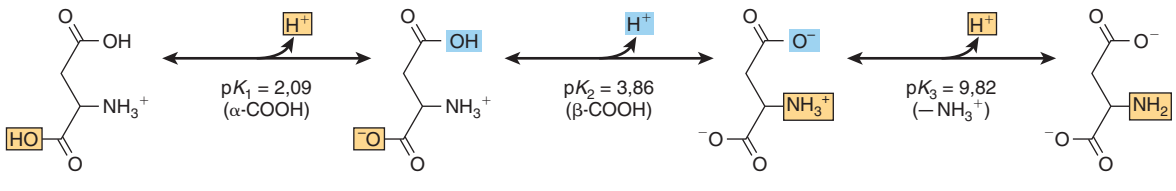
A estrutura **B** não pode existir em uma solução aquosa porque, em qualquer pH suficientemente baixo para protonar o grupamento carboxila, o grupamento amino também seria protonado. De modo similar, em qualquer pH suficientemente alto para que predomine um grupamento amino sem carga, o grupamento carboxila estará presente como R—COO^-. No entanto, a representação sem carga **B** é frequentemente utilizada para as reações que não envolvem os equilíbrios protônicos.

Os valores do pK_a expressam as forças dos ácidos fracos

As forças ácidas dos ácidos fracos são expressas como seus pK_a. Para moléculas com múltiplos prótons dissociáveis, o pK_a para cada grupamento ácido é designado ao se substituir o subscrito "a" por um número (Tabela 3-1). O grupamento imidazol da histidina e o grupamento guanidino da arginina existem como híbridos de ressonância com carga positiva distribuída entre os dois nitrogênios (histidina) ou por todos os três nitrogênios (arginina) (**Figura 3-2**). A carga global de um aminoácido – a soma algébrica de todos os grupamentos carregados positivamente e negativamente existentes – depende dos valores do pk_a de seus grupamentos funcionais e do pH do meio adjacente. Alterar a carga nos aminoácidos e em seus derivados ao modificar o pH facilita a separação física dos aminoácidos, dos peptídeos e das proteínas (ver Capítulo 4).

Em seu pH isoelétrico (pI), um aminoácido não comporta carga global

Os "zwitterions" constituem um exemplo de uma espécie **isoelétrica** – a forma de uma molécula que possui uma quantidade igual de cargas positivas e negativas e, dessa forma, é neutra do ponto de vista elétrico. **O pH isoelétrico, também chamado**



A Em ácido forte (pH abaixo de 1): carga total = +1

B Em torno do pH 3: carga total = 0

C Em torno do pH 6-8: carga total = −1

D Em base forte (pH acima de 11): carga total = −2

FIGURA 3-1 Os equilíbrios protônicos do ácido aspártico.

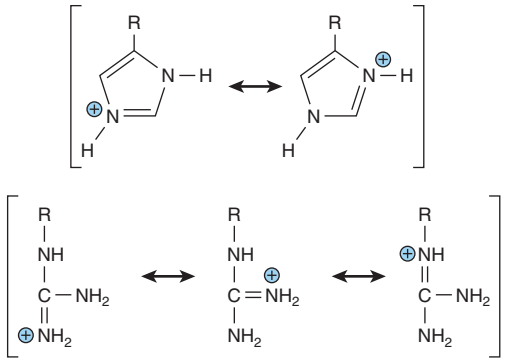


FIGURA 3-2 Híbridos de ressonância das formas protonadas dos grupamentos R da histidina e da arginina.

de pI, é o pH a meio caminho entre os valores de pK_a para as ionizações em ambos os lados das espécies isoelétricas. Para um aminoácido como a alanina, que possui apenas dois grupamentos dissociáveis, não existe ambiguidade. O primeiro pK_a (R—COOH) é 2,35 e o segundo pK_a (R—NH_3^+) é 9,69. Desta maneira, o pH isoelétrico (pI) da alanina é

$$\text{pI} = \frac{\text{p}K_1 + \text{p}K_2}{2} = \frac{2{,}35 + 9{,}69}{2} = 6{,}02$$

Para os ácidos polipróticos, o pI também é o pH a meio caminho entre os valores da pK_a em ambos os lados da espécies isoiônicas. Por exemplo, o pI para o ácido aspártico é

$$\text{pI} = \frac{\text{p}K_1 + \text{p}K_2}{2} = \frac{2{,}09 + 3{,}96}{2} = 3{,}02$$

Para a lisina, o pI é calculado a partir de

$$\text{pI} = \frac{\text{p}K_2 + \text{p}K_3}{2}$$

Considerações similares se aplicam a todos os ácidos polipróticos (p. ex., proteínas), independentemente do número de grupamentos dissociativos existente. No laboratório clínico, o conhecimento do pI orienta a seleção de condições para as separações eletroforéticas. Por exemplo, a eletroforese em pH 7,0 irá separar duas moléculas com valores de pI de 6,0 e 8,0, porque em pH 7,0 a molécula com um pI de 6,0 terá uma carga positiva total e aquela com um pI de 8,0 uma carga negativa total. Considerações similares se aplicam na compreensão de separações cromatográficas em suportes iônicos, como a dietilaminoetil (DEAE) celulose (ver Capítulo 4).

Os valores de pK_a variam com o ambiente

O ambiente de um grupo dissociável afeta seu pK_a. Os valores de pK_a dos grupamentos R dos aminoácidos livres em uma solução aquosa (Tabela 3-1) proporcionam, desta maneira, apenas uma diretriz aproximada para os valores da pK_a dos mesmos aminoácidos quando presentes nas proteínas. Um ambiente polar favorece a forma carregada (R—COO^- ou R—NH_3^+), e um ambiente apolar favorece a forma não carregada (R—COOH ou R—NH_2). Dessa maneira, um ambiente apolar *eleva* o pK_a de um grupamento carboxila (tornando-o um ácido mais fraco), mas *diminui* aquele de um grupamento amino (tornando-o um ácido mais forte). A presença de grupamentos carregados adjacentes pode reforçar ou contrapor-se aos efeitos solventes. O pK_a de um grupamento funcional dependerá, desta forma, de sua localização dentro de uma determinada proteína. As variações no pK_a podem englobar todas as unidades de pH (**Tabela 3-2**). Os valores do pK_a que divergem daqueles listados por até 3 unidades de pH são comuns nos sítios ativos das enzimas. Um exemplo extremo, de um ácido aspártico embutido na tiorredoxina, possui um pK_a acima de 9 – um desvio de mais de 6 unidades de pH.

A solubilidade dos aminoácidos reflete seu caráter iônico

As cargas conferidas por grupamentos funcionais dissociáveis dos aminoácidos asseguram que eles sejam prontamente solvatados por – e desta maneira são solúveis em – solventes polares, como a água e o etanol, mas são insolúveis em solventes apolares, como benzeno, hexano ou éter.

Os aminoácidos não absorvem a luz visível e, assim, são incolores. Contudo, a tirosina, a fenilalanina e, principalmente, o triptofano absorvem luz ultravioleta com comprimento de onda alto (250 a 290 nm). Como absorve a luz ultravioleta de forma aproximadamente dez vezes mais eficiente que a fenilalanina ou a tirosina, o triptofano faz a importante contribuição para a capacidade da maioria das proteínas para absorver a luz na região de 280 nm.

OS GRUPAMENTOS α-R DETERMINAM AS PROPRIEDADES DOS AMINOÁCIDOS

Como a glicina, o menor aminoácido, pode ser acomodada em locais inacessíveis a outros aminoácidos, ela frequentemente ocorre onde os peptídeos se curvam de maneira aguda. Os grupamentos R hidrofóbicos da alanina, valina, leucina e isoleucina e os grupamentos R aromáticos da fenilalanina, tirosina e triptofano se situam, em geral, principalmente no interior das proteínas citosólicas. Os grupamentos R carregados de aminoácidos

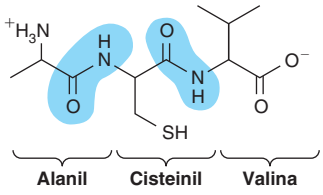
TABELA 3-2 Faixa típica de valores do pK_a para grupamentos ionizáveis nas proteínas

Grupamento dissociante	Faixa de pK_a
Carboxila α	3,5–4,0
COOH não α da Asp ou Glu	4,0–4,8
Imidazol da His	6,5–7,4
SH da Cys	8,5–9,0
OH da Tyr	9,5–10,5
α-Amino	8,0–9,0
ε-Amino da Lys	9,8–10,4
Guanidinio da Arg	~12,0

básicos e ácidos estabilizam conformações proteicas específicas por meio de interações iônicas ou de pontes salinas. Essas interações também funcionam nos sistemas de "retransmissão de carga" durante a catálise enzimática e no transporte de elétrons em mitocôndrias respiratórias. A histidina desempenha papéis únicos na catálise enzimática. O pK_a de seu próton imidazólico permite que a histidina atue em pH neutro tanto como catalisador de uma base, quanto como catalisador de um ácido, sem a necessidade de qualquer desvio ambientalmente induzido. O grupamento álcool primário da serina e o grupamento tioálcool (—SH) primário da cisteína são excelentes nucleófilos, podendo atuar como tais durante a catálise enzimática. Contudo, não se sabe se o grupamento álcool secundário da treonina, embora um bom nucleófilo, realiza um papel análogo na catálise. Os grupamentos —OH da serina, tirosina e treonina também participam na regulação da atividade das enzimas cujas atividades catalíticas dependem do estado de fosforilação de seus resíduos.

OS GRUPAMENTOS FUNCIONAIS DITAM AS REAÇÕES QUÍMICAS DOS AMINOÁCIDOS

Cada grupamento funcional de um aminoácido exibe a totalidade de suas reações químicas características. Para os grupamentos de ácido carboxílico, essas reações incluem a formação de ésteres, amidas e anidridos ácidos; para os grupamentos amino, a acilação, a amidação e a esterificação; e para os grupamentos —OH e —SH, oxidação e esterificação. A mais importante reação dos aminoácidos está na formação de uma ligação peptídica (sombreada).

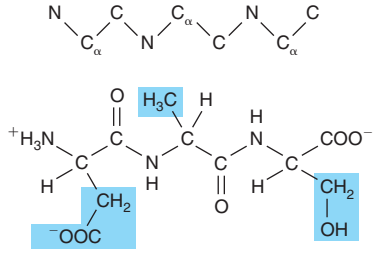


A sequência de aminoácidos determina a estrutura primária

O número e a ordem de todos os resíduos de aminoácidos em um polipeptídeo constituem sua estrutura primária. Os aminoácidos presentes nos peptídeos são chamados de resíduos aminoacil e são denominados ao se substituir os sufixos *-ato* ou *-ina* dos aminoácidos livres por *-il* (p. ex., alan*il*, aspart*il*, tiros*il*). Em seguida, os peptídeos são denominados como derivados do resíduo aminoacil do terminal *carboxi*. Por exemplo, Lys-Leu-Tyr-Gln é chamado de lis*il*-leuc*il*-tiros*il*-glutam*ina*. A terminação *-ina* na glutamina indica que seu grupamento α-carboxila *não* está envolvido na formação da ligação peptídica.

As estruturas peptídicas são fáceis de desenhar

Prefixos como *tri-* ou *octa-* indicam peptídeos com três ou oito resíduos, respectivamente. Por convenção, os peptídeos são escritos com o resíduo que comporta um grupamento α-amino livre à esquerda. Para desenhar um peptídeo, utilize um zigue-zague para representar a cadeia principal ou o esqueleto. Acrescente os átomos da cadeia principal, que ocorrem na ordem repetida: α-nitrogênio, α-carbono e o carbono da carbonila. Agora, acrescente um átomo de hidrogênio a cada carbono α e a cada nitrogênio do peptídeo, além de um átomo de oxigênio ao carbono da carbonila. Por fim, acrescente os grupamentos R apropriados (sombreados) a cada átomo de carbono α.



As abreviaturas com três letras ligadas por linhas retas representam uma estrutura primária ímpar. As linhas são omitidas para as abreviaturas de uma única letra.

Glu - Ala - Lys - Gly - Tyr - Ala
E A K G Y A

Alguns peptídeos contêm aminoácidos incomuns

Nos mamíferos, os hormônios peptídicos contêm, geralmente, apenas os 20 aminoácidos α geneticamente codificados ligados por ligações peptídicas comuns. Contudo, outros peptídeos podem conter aminoácidos não proteicos, derivados de aminoácidos proteicos ou aminoácidos ligados por uma ligação peptídica atípica. Por exemplo, o glutamato aminoterminal da glutationa, um tripeptídeo que participa no dobramento proteico e no metabolismo de xenobióticos (Capítulo 53), é ligado à cisteína por uma ligação não α-peptídica (**Figura 3-3**). O glutamato aminoterminal do hormônio liberador de tirotropina (TRH) é ciclizado em ácido piroglutâmico, sendo que o grupamento carboxila do resíduo prolil da carboxila terminal é amidado. Os aminoácidos não proteicos D-fenilalanina e ornitina estão presentes no peptídeo cíclico dos antibióticos tirocidina e gramicidina S, enquanto os opioides heptapeptídicos dermorfina e deltoforina, da pele das pererecas da América do Sul, contêm D-tirosina e D-alanina.

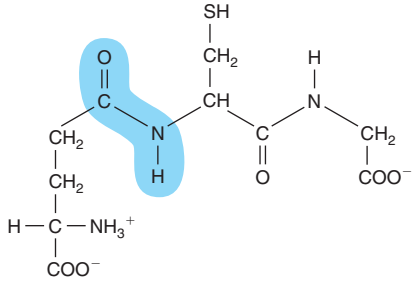


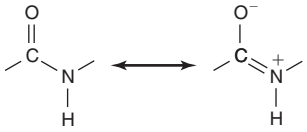
FIGURA 3-3 Glutationa (γ-glutamil-cisteinil-glicina). Observe a ligação peptídica não α que liga a Glu à Cys.

Os peptídeos são polieletrólitos

A ligação peptídica não tem carga em qualquer pH de interesse fisiológico. A formação de peptídeos a partir de aminoácidos é, portanto, acompanhada por uma perda global de uma carga positiva e uma carga negativa por ligação peptídica formada. Apesar disso, os peptídeos possuem carga no pH fisiológico devido a seus grupamentos carboxila e amino terminais e, quando presentes, por seus grupamentos R ácidos ou básicos. Da mesma maneira que para os aminoácidos, a carga total em um peptídeo depende do pH de seu ambiente e dos valores de pK_a de seus grupamentos dissociativos.

A ligação peptídica tem um caráter de dupla ligação parcial

Embora os peptídeos sejam escritos como se uma ligação simples ligasse os átomos de carboxila α e nitrogênio α, essa ligação exibe, na realidade, um caráter de ligação dupla parcial:



Desta maneira, não há liberdade de rotação em torno da ligação que une o carbono da carbonila e o nitrogênio de uma ligação peptídica. Por conseguinte, os átomos O, C, N e H de uma ligação peptídica são coplanares. A semirrigidez imposta da ligação peptídica traz importantes consequências para a maneira pela qual os peptídeos e as proteínas se dobram para gerar estruturas de ordem superior. As setas marrons circulares (**Figura 3-4**) indicam a rotação livre em torno das ligações remanescentes da estrutura polipeptídica.

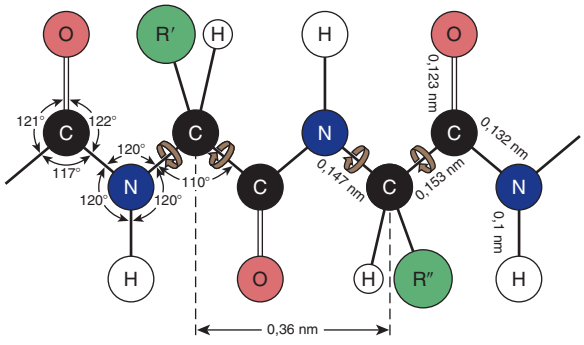


FIGURA 3-4 Dimensões de uma cadeia polipeptídica totalmente estendida. Os quatro átomos da ligação peptídica são coplanares. A rotação livre pode acontecer em torno das ligações que conectam o carbono α ao nitrogênio α e ao carbono da carbonila α (setas marrons). Assim, a cadeia polipeptídica estendida é uma estrutura semirrígida com dois terços dos átomos do esqueleto mantidos em uma relação planar fixa entre si. A distância entre os átomos de carbono α adjacentes é de 0,36 nm (3,6 Å). As distâncias interatômicas e os ângulos de ligação, que não são equivalentes, também são mostrados. (Redesenhada e reproduzida, com autorização, de Pauling L, Corey LP, Branson HR: The structure of proteins: Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. Proc Natl Acad Sci USA 1951; 37:205.)

As forças não covalentes restringem as conformações de peptídeos

A dobra de um peptídeo provavelmente ocorre coincidente com sua biossíntese (ver Capítulo 37). A conformação fisiologicamente ativa reflete as contribuições coletivas da sequência de aminoácidos, impedimento estérico e interações não covalentes (p. ex., pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas) entre os resíduos. As conformações comuns incluem as hélices α e as folhas β-pregueadas (ver Capítulo 5).

ANÁLISE DO CONTEÚDO DE AMINOÁCIDOS DOS MATERIAIS BIOLÓGICOS

Para se determinar a identidade de cada aminoácido existente em uma proteína, primeiramente ela é tratada com ácido clorídrico quente para hidrolisar as ligações peptídicas. Existem diversos métodos para a separação e identificação dos aminoácidos derivados de um hidrolisado proteico ou a partir da urina ou de outros líquidos biológicos. Uma conduta consiste em reagir os aminoácidos com o 6-amino-*N*-hidroxissuccinimidil carbamato para formar derivados fluorescentes que podem ser separados por cromatografia líquida de alta eficiência (ver Capítulo 4). Uma conduta alternativa, que requer apenas um mínimo de equipamentos, emprega a cromatografia de partição sobre um suporte sólido, geralmente uma folha de papel de filtro (cromatografia em papel) ou uma fina camada de celulose em pó ou gel de sílica sobre um suporte inerte (cromatografia em camada delgada ou TLC). Os aminoácidos existentes são resolvidos por uma fase móvel que contém uma mistura de componentes polares e apolares miscíveis (p. ex., *n*-butanol, ácido fórmico e água). Conforme a fase móvel sobe pela camada delgada, seus componentes polares se associam aos grupamentos polares do suporte. Portanto, o solvente se torna cada vez menos polar à medida que migra para cima na camada delgada. Por conseguinte, os aminoácidos se dividem entre uma fase estacionária polar e uma fase móvel menos polar ("cromatografia de partição"). Os aminoácidos apolares (p. ex., Leu, Ile) migram até uma maior distância, pois passam a maior parte de seu tempo na fase móvel. Os aminoácidos polares (p. ex., Glu, Lys) percorrem a distância mínima a partir da origem, pois passam uma elevada proporção de seu tempo na fase estacionária, consistindo em uma camada de moléculas solventes polares imobilizadas por sua associação com a celulose ou com o suporte de sílica. Após a remoção do solvente pela secagem ao ar livre, os aminoácidos são visualizados com o emprego da ninhidrina, a qual forma produtos purpúreos com os α-aminoácidos, embora o produto fique amarelado com a prolina e a hidroxiprolina.

RESUMO

- Os D-aminoácidos e os não α-aminoácidos ocorrem na natureza, mas apenas os L-α-aminoácidos estão presentes nas proteínas.
- Todos os aminoácidos possuem pelo menos dois grupamentos funcionais fracamente ácidos, R—NH_3^+ e R—COOH. Muitos

também possuem grupamentos funcionais fracamente ácidos adicionais, como —OH, —SH, moléculas guanidino ou imidazol.

- Os valores do pK_a de todos os grupamentos funcionais de um aminoácido ditam sua carga global em um determinado pH. O pI é o pH em que um aminoácido não comporta carga global e, desta maneira, não se move em um campo elétrico com corrente direta.
- Dentre as reações bioquímicas dos aminoácidos, a mais importante é a formação das ligações peptídicas.
- Os grupamentos R dos aminoácidos determinam suas funções bioquímicas próprias. Os aminoácidos são classificados como básicos, ácidos, aromáticos, alifáticos ou portadores de enxofre com base nas propriedades de seus grupamentos R.
- Os peptídeos são denominados pelo número de resíduos de aminoácidos existente, e como derivados do resíduo do terminal carboxílico. A estrutura primária de um peptídeo é sua sequência de aminoácidos, começando desde o resíduo aminoterminal.
- O caráter de dupla ligação parcial da ligação que liga o carbono da carbonila e o nitrogênio de um peptídeo torna os quatro átomos da ligação peptídica coplanares e restringe o número das possíveis conformações do peptídeo.

REFERÊNCIAS

Doolittle RF: Reconstructing history with amino acid sequences. Protein Sci 1992;1:191.

Gladyschev VN, Hatfield DL: Selenocysteine-containing proteins in mammals. J Biomed Sci 1999;6:151.

Kolodkin-Gal I: D-Amino acids trigger biofilm disassembly. Science 2010;328:627.

Kreil G: D-Amino acids in animal peptides. Annu Rev Biochem 1997;66:337.

Nokihara K, Gerhardt J: Development of an improved automated gas-chromatographic chiral analysis system: application to nonnatural amino acids and natural protein hydrolysates. Chirality 2001;13:431.

Papp LV: From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. Antioxidants Redox Signal 2007;9:775.

Sanger F: Sequences, sequences, and sequences. Annu Rev Biochem 1988;57:1.

Stadtman TC: Selenocysteine. Annu Rev Biochem 1996;65:83.

Wilson NA, Barbar E, Fuchs JA, et al: Aspartic acid 26 in reduced *Escherichia coli* thioredoxin has a pK_a greater than 9. Biochemistry 1995;34:8931.

CAPÍTULO

4

Proteínas: Determinação da Estrutura Primária

Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever os múltiplos métodos cromatográficos comumente empregados para o isolamento de proteínas a partir de materiais biológicos.
- Explicar como os cientistas analisam a sequência da estrutura de uma proteína a fim de obter opiniões sobre sua possível função fisiológica.
- Listar várias das alterações pós-tradução que as proteínas sofrem durante sua vida e a influência destas modificações sobre a função e o destino de uma proteína.
- Descrever a base química do método Edman para determinar a estrutura primária.
- Fornecer três motivos pelos quais a espectrometria de massa (MS) suplantou em grande parte os métodos químicos para a determinação da estrutura primária das proteínas e para a detecção das modificações pós-tradução.
- Explicar por que a MS pode detectar as modificações pós-tradução que não são detectadas pelo sequenciamento de Edman ou pelo sequenciamento do DNA.
- Descrever como a clonagem do DNA e a biologia molecular tornam a determinação das estruturas primárias das proteínas muito mais rápidas e eficientes.
- Explicar o que significa "proteoma" e citar exemplos de seu significado potencial final.
- Comentar sobre as contribuições da genômica, algoritmos computadorizados e bases de dados para a identificação de janelas de leitura aberta (ORFs) que codificam uma determinada proteína.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

As proteínas são macromoléculas complexas dos pontos de vista físico e funcional que realizam múltiplos papéis criticamente importantes. Por exemplo, uma rede proteica interna, o citoesqueleto (Capítulo 49) mantém a forma e a integridade física da célula. Os filamentos de actina e miosina formam a maquinaria contrátil do músculo (Capítulo 49). A hemoglobina transporta o oxigênio (Capítulo 6), enquanto os anticorpos circulantes defendem contra os invasores estranhos (Capítulo 50). As enzimas catalisam as reações que geram energia, sintetizam e degradam as biomoléculas, replicam e transcrevem os genes, processam os mRNAs, etc. (Capítulo 7). Os receptores capacitam as células a sentir e responder aos hormônios e a outros fatores ambientais (Capítulos 41 e 42). As proteínas estão sujeitas a alterações físicas e funcionais que espelham o ciclo de vida do organismo em que elas residem. Uma proteína típica "nasce" na tradução (Capítulo 37), amadurece por meio dos eventos de processamento pós-tradução, como a proteólise seletiva (Capítulos 9 e 37), alterna entre os estados ativo e inativo por meio da intervenção dos fatores reguladores (Capítulo 9), envelhece por meio da oxidação, deaminação, etc. (Capítulo 52) e "morre" quando degradada em seus aminoácidos componentes (Capítulo 29). Uma meta importante da medicina molecular consiste em identificar os biomarcadores, como as proteínas e/ou as modificações das proteínas cuja presença, ausência ou deficiência está associada a doenças ou estados fisiológicos específicos (**Figura 4-1**).

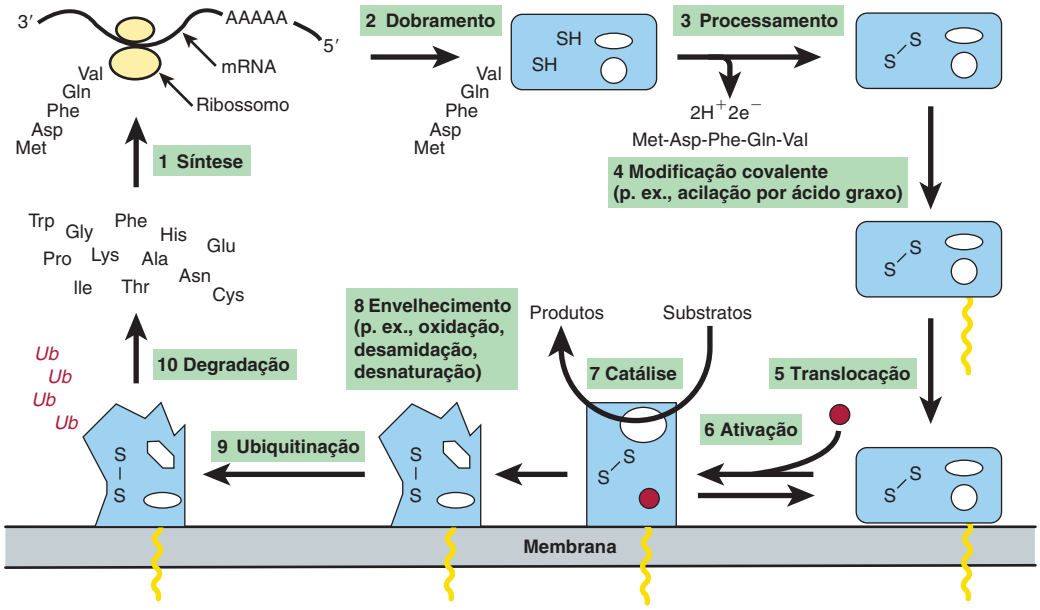


FIGURA 4-1 Representação diagramática do ciclo de vida de uma suposta proteína. (1) O ciclo de vida começa com a síntese em um ribossomo de uma cadeia polipeptídica, cuja estrutura primária é ditada por um mRNA. (2) À medida que a síntese prossegue, o polipeptídeo começa a se dobrar em sua conformação original (azul). (3) O dobramento pode ser acompanhado pelos eventos de processamento como a clivagem proteolítica de uma sequência líder *N*-terminal (Met-Asp-Phe-Gln-Val) ou pela formação de ligações dissulfeto (S—S). (4) As modificações covalentes subsequentes podem, por exemplo, acoplar uma molécula de ácido graxo (amarela) para (5) a translocação da proteína modificada para uma membrana. (6) A ligação de um efetor alostérico (vermelho) pode deflagrar a adoção de uma conformação cataliticamente ativa. (7) Com o passar do tempo, as proteínas são lesionadas por ataques químicos, desamidação ou desnaturação, e (8) podem ser "marcadas" pela ligação covalente de diversas moléculas de ubiquitina (*Ub*). (9) A proteína ubiquitinada é subsequentemente degradada em seus aminoácidos componentes, os quais se tornam disponíveis para a síntese de novas proteínas.

PROTEINAS E PEPTÍDEOS DEVEM SER PURIFICADOS ANTES DA ANÁLISE

A proteína altamente purificada é essencial para o exame detalhado de suas propriedades físicas e funcionais. As células possuem milhares de proteínas diferentes, cada qual em quantidades muito variadas. O isolamento de uma proteína específica em quantidades suficientes para a análise de suas propriedades representa, assim, um desafio formidável que pode exigir a aplicação sucessiva de múltiplas técnicas de purificação. A precipitação seletiva explora as diferenças na solubilidade relativa das proteínas individuais como uma função do pH (precipitação isoelétrica), polaridade (precipitação com etanol ou acetona) ou concentração de sal (*salting out* com sulfato de amônio). As técnicas cromatográficas separam uma proteína de outra com base na diferença de seu tamanho (cromatografia por exclusão por tamanho), carga (cromatografia de troca iônica), hidrofobicidade (cromatografia por interação hidrofóbica) ou capacidade de se ligar a um ligante específico (cromatografia por afinidade).

Cromatografia de coluna

Na cromatografia de coluna, a matriz da fase estacionária consiste em pequenas esferas carregadas em um recipiente cilíndrico de vidro, de plástico ou de aço chamado de coluna. As fritas permeáveis ao líquido confinam as esferas dentro desse espaço, enquanto permitem que o líquido da fase móvel flua ou permeie por meio da coluna. As esferas da fase estacionária podem ser quimicamente derivadas para cobrir sua superfície com grupamentos ácidos, básicos, hidrofóbicos ou semelhantes a ligantes necessários para a cromatografia de troca iônica, de interação hidrofóbica ou por afinidade. À medida que o líquido da fase móvel emerge a partir da coluna, ele é automaticamente coletado em uma série de pequenas porções denominadas frações. A **Figura 4-2** demonstra a disposição básica de um sistema de cromatografia de bancada simples.

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

As matrizes de cromatografia de coluna de primeira geração consistiam em polímeros de oligossacarídeos longos e entrelaçados moldados em esferas com aproximadamente um décimo de milímetro de diâmetro. Infelizmente, seu tamanho relativamente grande conturbava o fluxo da fase móvel e limitava a área de superfície disponível. A redução do tamanho da partícula propiciou o potencial para aumentar muito a resolução. No entanto, a resistência criada pela matriz contida mais rigidamente exigiu a utilização de pressões muito altas que esmagariam as esferas de polissacarídeo macias e esponjosas e de materiais similares, tais como a acrilamida. Mais adiante, foram desenvolvidos métodos para fabricar partículas de silicone com o tamanho e a forma necessários, derivatizar sua superfície com diversos grupamentos funcionais, e embalá-las em colunas de aço inoxidável capazes de suportar pressões de vários milhares psis. Devido a seus maiores

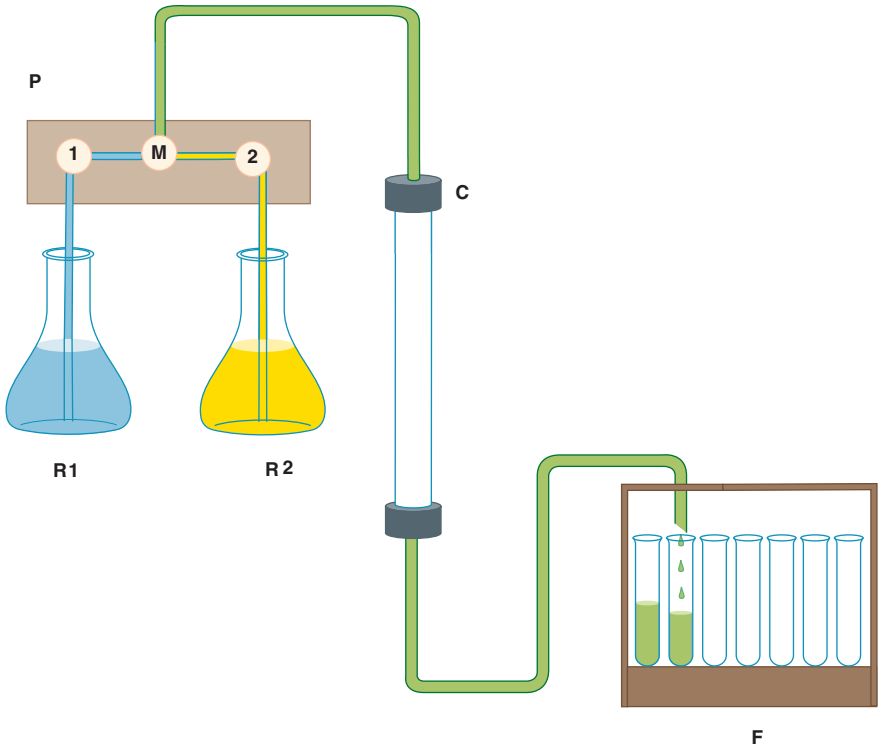


FIGURA 4-2 Componentes de um típico aparelho de cromatografia líquida. R1 e R2: Reservatórios do líquido da fase móvel. P: Sistema de bombeamento programável contendo duas bombas, 1 e 2, e um compartimento de mistura, M. O sistema pode ser ativado para bombear o líquido de apenas um reservatório, mudar os reservatórios em algum ponto predeterminado para gerar um gradiente acentuado, ou para misturar os líquidos a partir de dois reservatórios em proporções que variam com o tempo de modo a criar um gradiente contínuo. C: Coluna de vidro, metal ou plástico contendo a fase estacionária. F: Coletor fracionado para coletar partes, chamadas de *frações*, do líquido eluente em tubos de ensaio separados.

poderes de resolução, os sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência substituíram as antigas colunas de vidro comuns no laboratório de purificação de proteína.

Cromatografia de exclusão por tamanho

A cromatografia de exclusão por tamanho – ou de filtração em gel – separa as proteínas com base em seu **raio de Stokes**; o raio da esfera que elas ocupam à medida que elas caem na solução. Uma proteína alongada em queda ocupa um volume maior que uma proteína esférica de mesma massa. A cromatografia de exclusão por tamanho emprega esferas porosas (**Figura 4-3**). Os poros são análogos às indentações na margem de um rio. À medida que os objetos se movem para baixo, aqueles que entram em uma indentação são retardados até que retornem para a corrente principal. De maneira similar, as proteínas com raio de Stokes muito grande para entrar nos poros (proteínas excluídas) permanecem no fluxo da fase móvel, e emergem *antes* das proteínas capazes de entrar nos poros (proteínas incluídas). Assim, as proteínas emergem de uma coluna de filtração em gel na ordem descendente de seus raios de Stokes.

Cromatografia de troca iônica

Na cromatografia de troca iônica, as proteínas interagem com a fase estacionária por meio de interações entre cargas. As proteínas com carga positiva global em um determinado pH irão aderir firmemente às esferas com grupamentos funcionais carregados negativamente como carboxilatos ou sulfatos (trocadores de cátion). De maneira similar, as proteínas com carga negativa total aderem às esferas com grupamentos funcionais positivamente carregados, comumente aminas terciárias ou quaternárias (trocadores de ânions). As proteínas não aderentes fluem por meio da matriz e são depuradas. As proteínas ligadas são então seletivamente deslocadas por meio da elevação gradual na força iônica da fase móvel, enfraquecendo, desta forma, as interações entre cargas. As proteínas eluem em ordem inversa da força de suas interações com a fase estacionária.

Cromatografia por interação hidrofóbica

A cromatografia por interação hidrofóbica separa as proteínas com base em suas tendências para se associar com uma matriz de fase estacionária revestida com grupamentos hidrofóbicos (p. ex., fenil Sepharose, octil Sephadex). As proteínas com superfícies hidrofóbicas expostas aderem à matriz por meio de interações hidrofóbicas que são acentuadas pelo emprego de uma fase móvel de força iônica elevada. Após as proteínas não aderentes serem depuradas, a polaridade da fase móvel é diminuída por meio da redução gradual da concentração de sal da fase móvel fluente. Quando a interação entre a proteína e a fase estacionária é particularmente forte, o etanol ou o glicerol podem ser adicionados

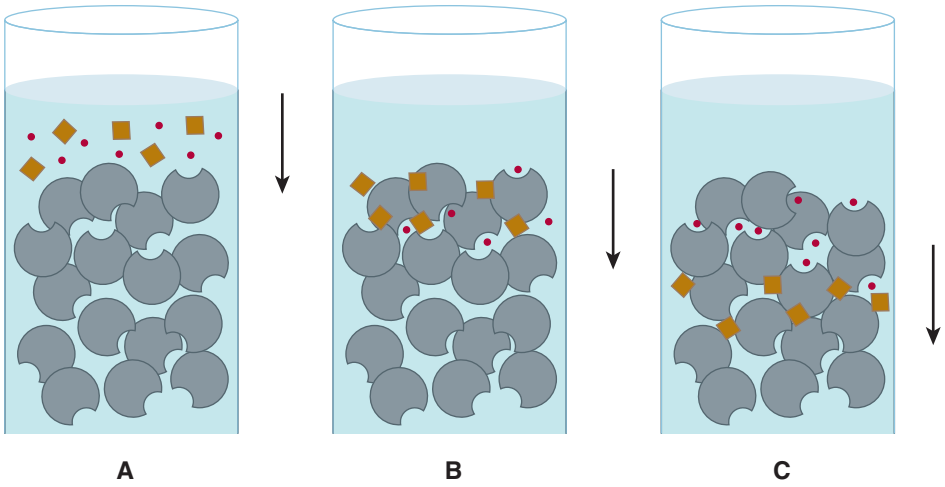


FIGURA 4-3 Cromatografia de exclusão por tamanho. A: Uma mistura de grandes moléculas (marrons) e pequenas moléculas (vermelhas) é aplicada no alto de uma coluna de filtração em gel. B: Ao entrar na coluna, as pequenas moléculas penetram nos poros na matriz de fase estacionária (cinzas), a partir da qual as grandes moléculas são excluídas. C: À medida que a fase móvel (azul) flui para baixo na coluna, as grandes moléculas excluídas fluem com ela, enquanto as pequenas moléculas, que são temporariamente protegidas do fluxo quando estão dentro dos poros, ficam mais distantes.

à fase móvel para diminuir sua polaridade e enfraquecer ainda mais as interações hidrofóbicas.

Cromatografia por afinidade

A cromatografia por afinidade explora a elevada seletividade da maioria das proteínas por seus ligantes. As enzimas podem ser purificadas por cromatografia por afinidade usando substratos imobilizados, produtos, coenzimas ou inibidores. Na teoria, apenas as proteínas que interagem com o ligante imobilizado sofrem adesão. As proteínas ligadas são então eluídas pela competição com o ligante solúvel livre ou, de modo menos seletivo, pelo rompimento das interações proteína-ligante usando ureia, cloridrato de guanidina, pH levemente ácido ou altas concentrações de sal. As matrizes de fase estacionária comercialmente disponíveis contêm ligantes como NAD^+ ou análogos do ATP. A purificação das proteínas expressas de forma recombinante é frequentemente facilitada ao se modificar o gene clonado para acrescentar um novo domínio de fusão destinado a interagir com um ligante ligado à matriz específica (Capítulo 7).

A pureza da proteína é avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

O método mais amplamente utilizado para determinar a pureza de uma proteína é o SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) na presença do detergente aniônico dodecil sulfato sódico (SDS). A eletroforese separa as biomoléculas carregadas com base nas velocidades com que elas migram em um campo elétrico aplicado. Para o SDS-PAGE, a acrilamida é polimerizada e sofre ligação cruzada para formar uma matriz porosa. O SDS liga-se às proteínas em uma proporção de uma molécula de SDS por duas ligações peptídicas, provocando o desdobramento ou a desnaturação do polipeptídeo. Quando usado em conjunto com o 2-mercaptoetanol ou ditiotreitol para reduzir e quebrar as ligações dissulfeto (**Figura 4-4**), o SDS-PAGE separa os polipeptídeos componentes de proteínas multiméricas. O grande número de moléculas de SDS aniônicas, cada qual comportando uma carga de −1, supera as contribuições de carga dos grupamentos funcionais de aminoácidos endógenos nos polipeptídeos. Como a relação de carga/massa de cada complexo SDS-polipeptídeo é aproximadamente igual, a resistência física que cada peptídeo encontra à medida que ele se move por meio da matriz de acrilamida determina a velocidade da migração. Como os grandes

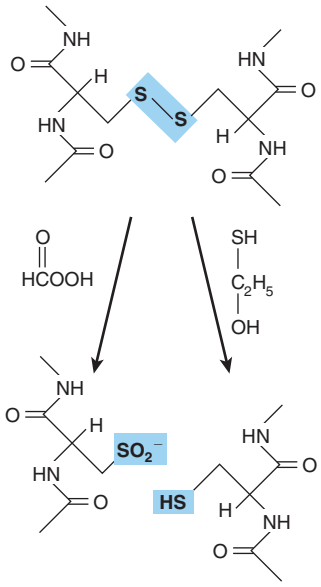


FIGURA 4-4 A clivagem oxidativa das cadeias polipeptídicas adjacentes ligadas por pontes dissulfeto (destacadas em azul) pelo ácido perfórmico (*esquerda*) ou por clivagem redutora por meio do β-mercaptoetanol (*direita*) forma dois peptídeos que contêm os resíduos de ácido cisteico ou resíduos cisteinil, respectivamente.

complexos encontram maior resistência, os polipeptídeos são separados com base em sua massa molecular relativa (M_r). Os polipeptídeos individuais aprisionados no gel de acrilamida depois da retirada do campo elétrico são visualizados por coloração com corantes como o azul Coomassie (**Figura 4-5**).

Focalização isoelétrica (IEF)

Os tampões iônicos chamados de anfolitos e um campo elétrico aplicado são usados para gerar um gradiente de pH dentro de uma matriz de poliacrilamida. As proteínas aplicadas migram até que alcancem a região da matriz onde o pH se compatibiliza com seus pontos isoelétricos (pI), o pH em que a carga global de uma molécula é 0. A IEF é utilizada em conjunto com o SDS-PAGE para a eletroforese bidimensional, separando os polipeptídeos com base no pI em uma dimensão e na M_r na outra (**Figura 4-6**). A eletroforese bidimensional é particularmente bem adequada para separar os componentes de misturas complexas de proteínas.

SANGER FOI O PRIMEIRO A DETERMINAR A SEQUÊNCIA DE UM POLIPEPTÍDEO

A insulina madura consiste em uma cadeia A de 21 resíduos e em uma cadeia B com 30 resíduos ligadas por ligações dissulfeto. Frederick Sanger reduziu as ligações dissulfeto (Figura 4-4), separou as cadeias A e B e clivou cada cadeia em peptídeos menores usando tripsina, quimotripsina e pepsina. Os peptídeos resultantes foram então isolados e tratados com ácido para hidrolisar uma porção das ligações peptídicas e gerar peptídeos pequenos com dois ou três aminoácidos. Cada peptídeo reagiu com o 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (reagente de Sanger), o que derivatizou os grupamentos α-amino expostos dos resíduos aminoterminais. O conteúdo de aminoácido de cada peptídeo foi então determinado e o aminoácido aminoterminal foi identificado. O grupamento ε-amino da lisina também reagiu com o reagente de Sanger; mas, como uma lisina aminoterminal reage com 2 mols do reagente de Sanger, ela é prontamente diferenciada de uma lisina no interior de um peptídeo. Trabalhando a partir de dipeptídeos e tripeptídeos com fragmentos progressivamente maiores, Sanger foi capaz de reconstruir a sequência completa da insulina, um feito pelo qual ele recebeu um Prêmio Nobel em 1958.

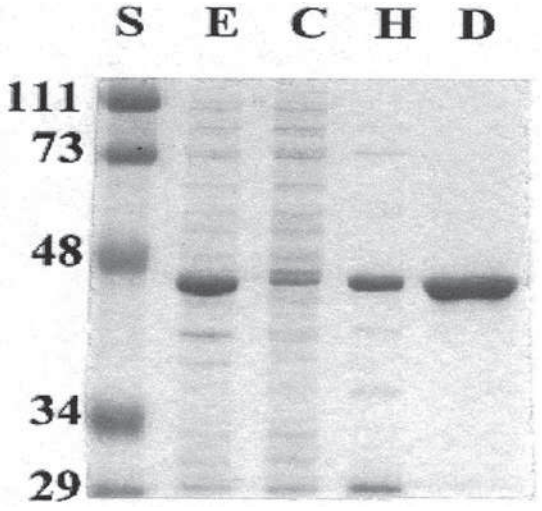


FIGURA 4-5 Uso do SDS-PAGE para observar a purificação sucessiva de uma proteína recombinante. O gel foi corado com azul Coomassie. São demonstrados os padrões de proteína (linha S) do M_r indicado, em kDa, extrato de células cruas (E), citosol (C), líquido sobrenadante de alta velocidade (H) e a fração de DEAE-Sepharose (D). A proteína recombinante possui massa de aproximadamente 45 kDa.

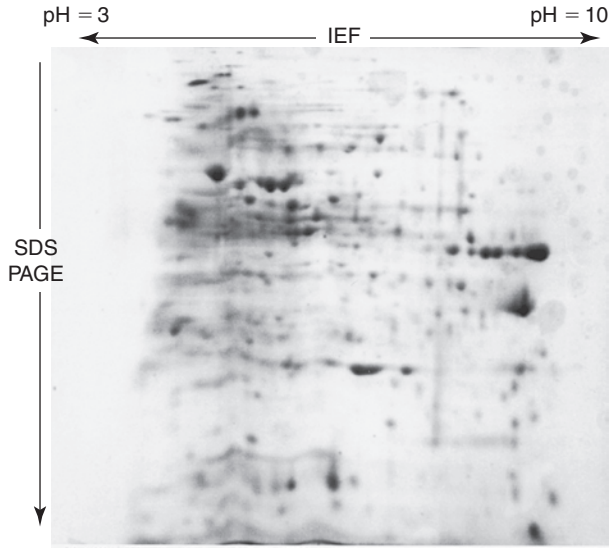


FIGURA 4-6 IEF bidimensional SDS-PAGE. O gel foi corado com azul de Coomassie. Um extrato bacteriano cru foi primeiramente submetido à focalização isoelétrica (IEF) em um gradiente de pH de 3-10. O gel com IEF foi então posicionado horizontalmente no ápice de um gel de SDS-PAGE e as proteínas são adicionalmente resolvidas por SDS-PAGE. Observe a resolução muito melhorada de polipeptídeos distintos em relação ao gel de SDS-PAGE comum (Figura 4-5).

A REAÇÃO DE EDMAN POSSIBILITA QUE OS PEPTÍDEOS E AS PROTEÍNAS SEJAM SEQUENCIADOS

Pehr Edman introduziu o fenilisotiocianato (reagente de Edman) para rotular seletivamente o resíduo aminoterminal de um peptídeo. Em contraste com o reagente de Sanger, o derivado feniltioidantoína (PTH) pode ser removido sob condições brandas para produzir um novo resíduo aminoterminal (**Figura 4-7**). Séries sucessivas de derivatização com o reagente de Edman podem, portanto, ser empregadas para sequenciar muitos resíduos de uma única amostra de peptídeo. Ainda assim, a determinação da sequência completa de uma proteína por meio de métodos químicos permanece como um processo que requer tempo e intenso trabalho ainda hoje.

As propriedades químicas heterogêneas dos aminoácidos denotam que cada etapa no procedimento represente um com-

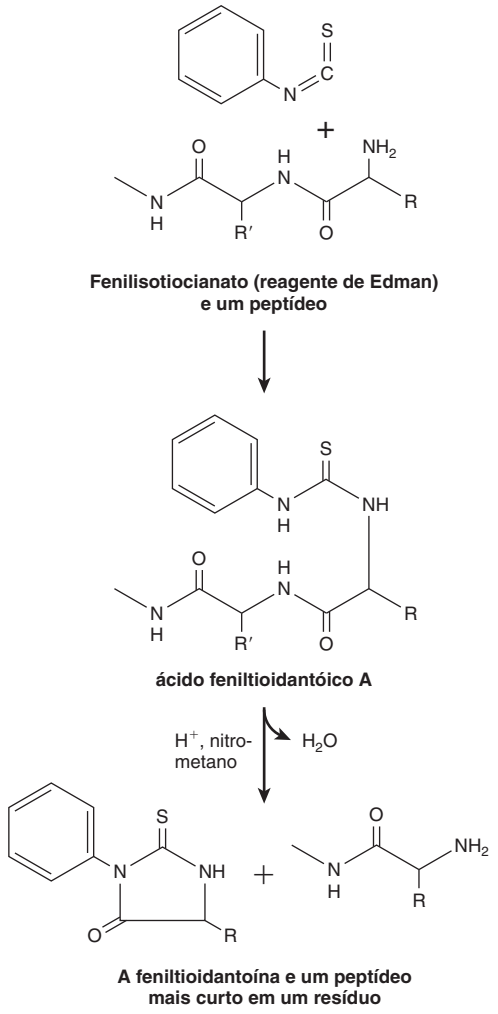


FIGURA 4-7 A reação de Edman. O fenilisotiocianato derivatiza o resíduo aminoterminal de um peptídeo como um ácido feniltioidantóico. O tratamento com ácido em um solvente não hidroxílico libera uma feniltioidantoína, a qual é subsequentemente identificada por sua mobilidade cromatográfica, e um peptídeo menor em um resíduo. Em seguida, o processo é repetido.

promisso entre a eficiência para qualquer aminoácido ou conjunto de aminoácidos em particular e a flexibilidade necessária para acomodar todos os 20 aminoácidos. Por conseguinte, cada etapa no processo age com eficiência menor que 100%, o que leva ao acúmulo de fragmentos polipeptídicos com *N*-terminais variados. Mais adiante, torna-se impossível diferenciar dos contaminantes o aminoácido PTH correto para aquela posição no peptídeo. Consequentemente, o comprimento de leitura para o sequenciamento de Edman varia de 5 a 30 resíduos de aminoácidos, dependendo da quantidade e da pureza do peptídeo.

A fim de determinar a sequência completa de um polipeptídeo com várias centenas de resíduos de comprimento, uma proteína deve ser primeiramente clivada em peptídeos menores, usando uma protease ou um reagente como o brometo de cianogênio. Após a purificação por meio da cromatografia líquida de alta eficiência em fase inversa (HPLC), esses peptídeos são então analisados pelo sequenciamento de Edman. De modo a reunir essas sequências peptídicas curtas para solucionar a sequência completa do polipeptídeo intacto, é necessário analisar os peptídeos cujas sequências se sobreponham entre si. Isso é feito ao se gerar múltiplos conjuntos de peptídeos usando mais de um método de clivagem. As grandes quantidades de proteína purificada necessárias para testar a fragmentação proteica múltipla e as condições de purificação de peptídeo constituem o segundo grande obstáculo das técnicas de sequenciamento proteico químico direto.

A BIOLOGIA MOLECULAR REVOLUCIONOU A DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA

As reações que derivatizam sequencialmente e clivam os aminoácidos PTH a partir da extremidade aminoterminal de um peptídeo são geralmente realizadas em um sequenciador automático. Em contrapartida, o sequenciamento do DNA é muito mais rápido e mais econômico. As técnicas recombinantes permitem que os pesquisadores fabriquem um suprimento quase infinito de DNA usando a amostra original como molde (Capítulo 39). Os métodos de sequenciamento de DNA, cuja química também foi desenvolvida por Sanger, possibilitam comumente que sequências de polidesoxirribonucleotídeos com algumas centenas de resíduos de comprimento sejam determinadas em uma única análise, enquanto os sequenciadores automáticos podem "ler" sequências com vários milhares de nucleotídeos de comprimento. O conhecimento do código genético possibilita que a sequência do polipeptídeo codificado seja determinada por meio da simples tradução da sequência de oligonucleotídeo de seu gene. Por outro lado, os primeiros biologistas moleculares idealizaram sondas de oligonucleotídeos complementares para identificar o clone de DNA contendo o gene de interesse ao inverter este processo e empregando um segmento da sequência de aminoácidos quimicamente determinada como molde. O advento da clonagem do DNA preconizou, desta maneira, o uso disseminado de uma conduta híbrida, na qual a química de Edman foi empregada para sequenciar uma pequena porção da proteína, explorando, assim, essa informação para determinar a sequência restante pela clonagem e pelo sequenciamento do DNA.

A GENÔMICA POSSIBILITA QUE AS PROTEÍNAS SEJAM IDENTIFICADAS A PARTIR DE PEQUENAS QUANTIDADES DE DADOS DA SEQUÊNCIA

Atualmente, o número de organismos para os quais foi feito o sequenciamento completo do DNA de seus genomas, sendo disponibilizado para a comunidade científica, alcança a casa das centenas (ver Capítulo 10). Essas sequências englobam quase a totalidade dos "organismos-modelos" comumente empregados nos laboratórios de pesquisa biomédica: *Homo sapiens*, rato, camundongo, *Escherichia coli*, *Drosophila melanogaster, Caenorhabditis elegans,* leveduras, etc, assim como de inúmeros patógenos. Enquanto isso, ao redor do mundo, grupos de sequenciadores de

DNA automatizados continuam a gerar dados da sequência do genoma com rapidez ainda maior e de maneira mais econômica. Desta forma, para a maioria dos cientistas pesquisadores, a sequência da(s) proteína(s) com que eles estão trabalhando já foi determinada e espera ser acessada em uma base de dados, como o GenBank (Capítulo 10). Tudo o que o cientista precisa é adquirir informações suficientes da sequência de aminoácidos a partir da proteína, por vezes tão pequena quanto cinco ou seis resíduos consecutivos, para fazer uma identificação inequívoca. Embora o requisito da informação da sequência de aminoácidos possa ser obtido usando a técnica de Edman, a atual espectrometria de massa (MS) surgiu como o método preferido para a identificação da proteína.

A ESPECTROMETRIA DE MASSA PODE DETECTAR MODIFICAÇÕES COVALENTES

A sensibilidade, a velocidade e a versatilidade superiores da MS substituíram a técnica de Edman como o principal método para determinar as sequências de peptídeos e proteínas. A MS é muito mais sensível e tolerante a respeito das variações na qualidade da amostra. Além disso, como a massa e a carga são propriedades comuns de uma ampla gama de biomoléculas, a MS pode ser empregada para analisar os metabólitos, carboidratos e as modificações pós-tradução como a fosforilação ou hidroxilação que acrescentam incrementos de massa prontamente identificados a uma proteína (**Tabela 4-1**). Essas modificações são difíceis de detectar usando a técnica de Edman e são indetectáveis na sequência de aminoácidos derivados do DNA.

ESPECTRÔMETROS DE MASSA SÃO FABRICADOS EM DIVERSAS CONFIGURAÇÕES

Em um espectrômetro de massa único quadrupolo simples, uma amostra é colocada sob vácuo e se permite que ela vaporize na presença de um doador de próton para gerar uma carga positiva.

TABELA 4-1 Aumentos de massa resultantes de modificações pós-translacionais comuns

Modificação	Aumento de massa (Da)
Fosforilação	80
Hidroxilação	16
Metilação	14
Acetilação	42
Miristoilação	210
Palmitoilação	238
Glicosilação	162

Em seguida, um campo elétrico impulsiona os cátions no sentido de um tubo de fuga curvo, onde eles encontram um campo magnético, o qual os deflete em um ângulo reto da sua direção original de fuga (**Figura 4-8**). A força que energiza o eletromagneto é gradualmente aumentada até que o trajeto de cada íon seja curvado o suficiente para colidir com um detector montado no final do tubo de voo. Para os íons com carga total idêntica, a força exigida para curvar sua trajetória na mesma extensão é proporcional às suas massas.

O tubo de voo para um espectrômetro de massa com tempo de voo (TOF) é linear. Após a vaporização da amostra na presença de um doador de próton, um campo elétrico é aplicado por curto prazo para acelerar os íons no sentido do detector no final do tubo de fuga. Para as moléculas de carga idêntica, a velocidade com que elas são aceleradas – e, daí, o tempo necessário para alcançar o detector – é inversamente proporcional às suas massas.

Em geral, os espectrômetros de massa quadrupolos são utilizados para determinar as massas de moléculas de 4.000 Da ou menos, enquanto os espectrômetros de massa de tempo de voo são empregados para determinar as grandes massas de proteínas completas. Diversas combinações de múltiplos quadrupolos ou a reflexão dos íons de volta para o tubo de fuga linear de um espectrômetro de massa TOF são usadas para criar instrumentos mais sofisticados.

Os peptídeos podem ser volatilizados para a análise por ionização do *eletrospray* ou por dessorção à *laser* assistida por matriz

A análise de peptídeos e proteínas por espectrometria de massa foi inicialmente comprometida pelas dificuldades na volatilização de grandes moléculas orgânicas. Embora pequenas moléculas orgânicas possam ser prontamente volatilizadas por meio do aquecimento em um vácuo (**Figura 4-9**), as proteínas, os oligonucleotídeos e outros eram destruídos sob essas condições. Apenas quando técnicas confiáveis foram idealizadas para dispersar os peptídeos, proteínas e outras grandes biomoléculas na fase de vapor é que foi possível aplicar a MS para a análise estrutural e determinação da sequência destes. A dispersão na fase de vapor é feita por meio da **ionização por *eletrospray*** e por **dessorção e ionização à *laser* assistida por matriz**, denominada **MALDI**. Na ionização por *eletrospray*, as moléculas a ser analisadas são dissolvidas em um solvente volátil e introduzidas na câmara de amostra em um fluxo pequeno por meio de um capilar (Figura 4-9). À medida que a gotícula do líquido emerge na câmara de amostra, o solvente dispersa rapidamente, deixando a macromolécula suspensa na fase gasosa. A sonda carregada serve para ionizar a amostra. A ionização por *eletrospray* é frequentemente usada para analisar os peptídeos e as proteínas à medida que eles eluem a partir de uma HPLC ou de outra coluna de cromatografia já dissolvida em um solvente volátil. Na MALDI, a amostra é misturada com uma matriz líquida contendo um corante absorvente de luz e uma fonte de prótons. Na câmara de amostra, a mistura é excitada com o emprego de um *laser*, provocando a dispersão da matriz adjacente em uma fase de vapor de modo tão rápido que evita aquecer os peptídeos ou proteínas embebidos (Figura 4-9).

Os peptídeos dentro do espectrômetro de massa podem ser clivados em unidades menores por colisões com os átomos

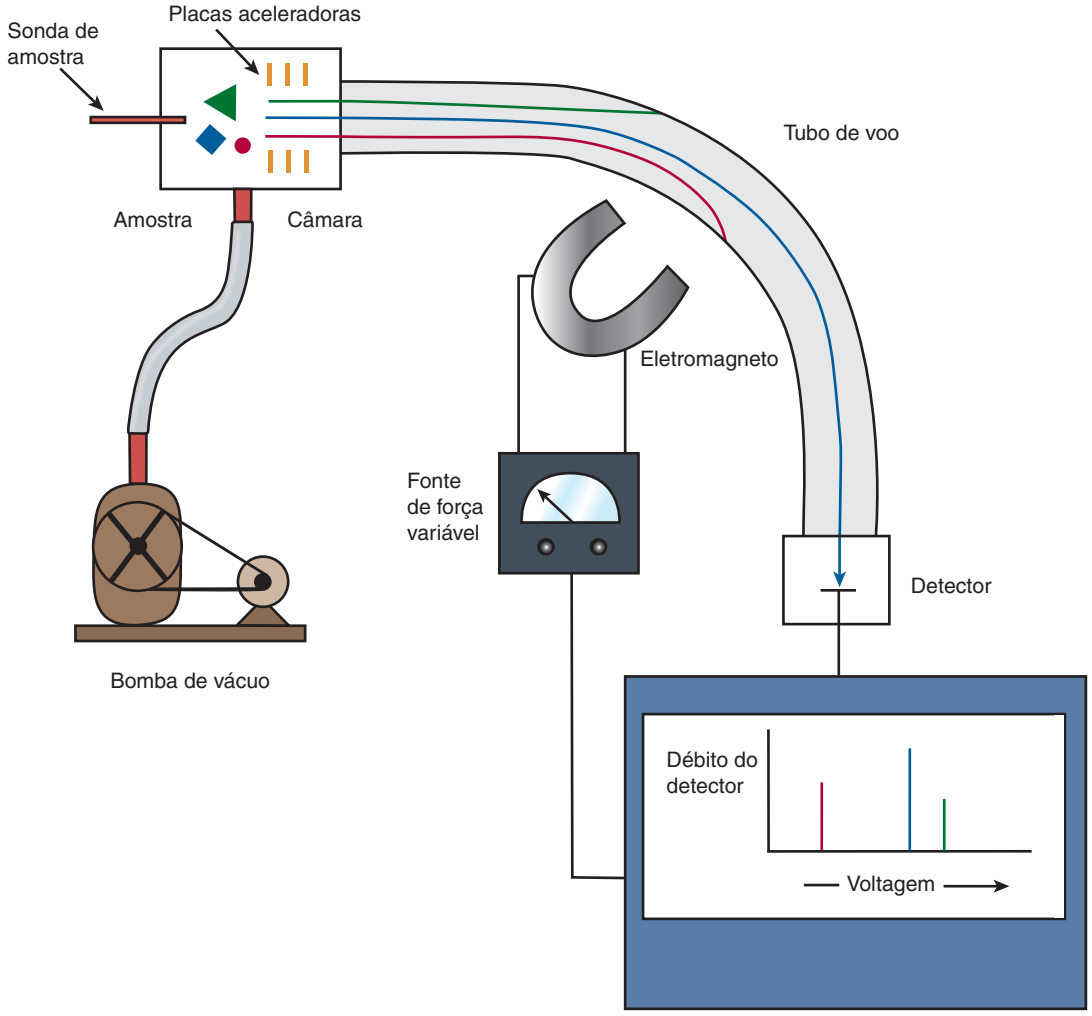


FIGURA 4-8 Componentes básicos de um espectrômetro de massa simples. Uma mistura de moléculas, representada por um círculo vermelho, um triângulo verde e um diamante azul, é vaporizada em um estado ionizado na câmara de amostra. Estas moléculas são então aceleradas pelo tubo de voo por um potencial elétrico aplicado na grade aceleradora (amarelo). Um eletromagneto com força de campo ajustável aplica um campo magnético que deflete a fuga de íons individuais até que eles colidam com o detector. Quanto maior for a massa do íon, mais alto será o campo magnético necessário para focalizá-lo no detector.

de hélio ou argônio neutros (dissociação induzida por colisão), determinando as massas de cada fragmento. Como as ligações peptídicas são muito mais lábeis que as ligações entre carbonos, os fragmentos mais abundantes diferirão entre si por unidades equivalentes a um ou dois aminoácidos. Como a massa molecular de cada aminoácido é única, com a exceção da (1) leucina e isoleucina e da (2) glutamina e lisina, a sequência do peptídeo pode ser reconstruída a partir das massas de seus fragmentos.

Espectrometria de massa em *tandem*

As misturas de peptídeos complexos podem ser atualmente analisadas sem purificação prévia pela MS em *tandem*, a qual emprega o equivalente de dois espectrômetros de massa ligados em série. Por esse motivo, esses instrumentos aleatórios são frequentemente referidos como **MS-MS**. O primeiro espectrômetro de massa separa cada peptídeo com base em suas diferenças na massa. Ao ajustar a força do campo do primeiro magneto, um peptídeo único pode ser direcionado para o segundo espectrômetro de massa, onde os fragmentos são produzidos e suas massas determinadas. De modo alternativo, eles podem ser mantidos em uma **armadilha iônica**, posicionada entre os dois quadrupolos, e passados seletivamente para os segundos quadrupolos em lugar de serem perdidos quando os primeiros quadrupolos são definidos para selecionar íons de uma massa diferente.

Espectrometria de massa em *tandem* pode detectar anormalidades metabólicas

A MS aleatória pode ser empregada para triagem de amostras de sangue de recém-nascidos para a presença e concentrações de aminoácidos, ácidos graxos e outros metabólitos. As anormalidades nos níveis de metabólitos podem servir como indicadores diagnósticos para diversas patologias genéticas, como a fenilcetonúria, encefalopatia etilmalônica e acidemia glutárica do tipo 1.

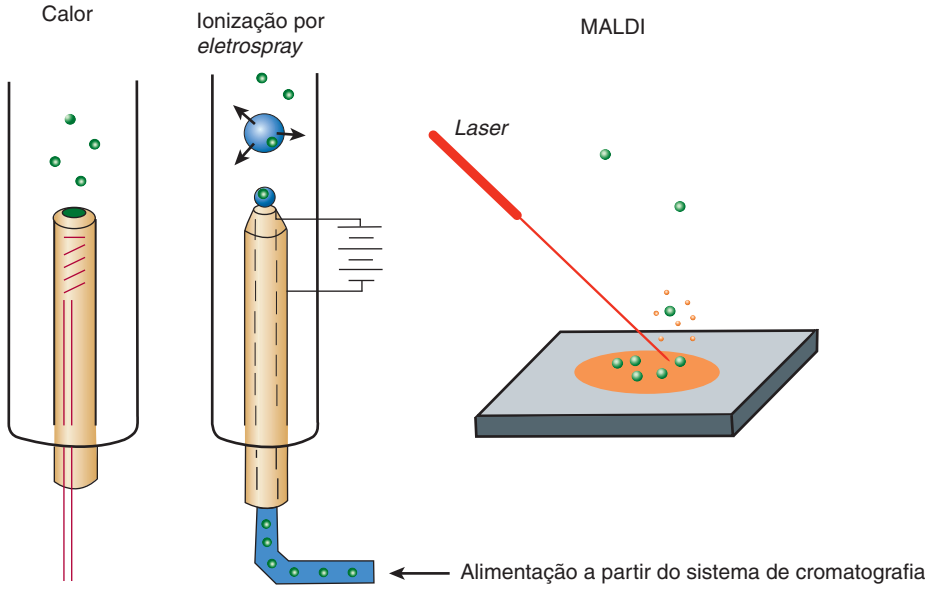


FIGURA 4-9 Três métodos comuns para vaporizar as moléculas na câmara de amostra de um espectrômetro de massa.

PROTEÔMICA E O PROTEOMA

O objetivo da proteômica é identificar a totalidade do complemento de proteínas elaboradas por uma célula sob condições diversas

Embora a sequência do genoma humano seja conhecida, o quadro fornecido pela genômica isolada é estático e incompleto. A proteômica visa identificar a totalidade do complemento das proteínas produzidas por uma célula em condições diversas. À medida que os genes são ativados e desativados, as proteínas são sintetizadas em determinados tipos de células em momentos específicos do crescimento ou da diferenciação e em resposta a estímulos externos. As células musculares expressam as proteínas não expressas pelas células nervosas, e o tipo de subunidades existente no tetrâmero da hemoglobina sofre alterações pré e pós-parto. Muitas proteínas sofrem modificações pós-tradução durante a maturação nas formas funcionalmente competentes ou como um meio de regular suas propriedades. Portanto, o conhecimento do genoma humano representa apenas o início da tarefa de descrever os organismos vivos em detalhes moleculares e de compreender a dinâmica de processos como o crescimento, o envelhecimento e a doença. Como o organismo humano contém milhares de tipos de células, cada qual contendo milhares de proteínas, o **proteoma** – o conjunto de todas as proteínas expressas por uma célula em um determinado momento – representa um alvo de dimensões formidáveis em movimento.

Eletroforese bidimensional e *chips* de arranjo de genes são usados para estudar a expressão da proteína

Uma meta da proteômica é a identificação das proteínas cujos níveis de expressão se correlacionam com eventos clinicamente significativos. A suposição é que as proteínas cujo aparecimento ou desaparecimento estão associados a uma condição fisiológica ou doença específica estão ligadas, de forma direta ou indireta, às suas causas e mecanismos fundamentais. A determinação dos proteomas característicos de cada tipo celular requer a eficiência máxima no isolamento e na identificação das proteínas individuais. A conduta contemporânea utiliza a automação robótica para acelerar a preparação da amostra e grandes géis bidimensionais para resolver as proteínas celulares. Os polipeptídeos individuais são então extraídos e analisados por meio do sequenciamento de Edman ou por espectrometria de massa. Embora apenas cerca de 1000 proteínas possam ser resolvidas em um único gel, a eletroforese bidimensional apresenta uma importante vantagem, pelo fato de que ela examina as próprias proteínas.

Uma conduta alternativa, chamada de tecnologia de identificação de proteína multidimensional (MudPIT), emprega séries sucessivas de cromatografia para resolver os peptídeos produzidos a partir da digestão de uma amostra biológica complexa em várias frações mais simples, as quais podem ser analisadas separadamente pela MS. **Os arranjos de genes, por vezes chamados de *chips* de DNA**, nos quais se detecta a expressão dos mRNAs que codificam as proteínas, proporcionam uma conduta complementar para a proteômica. Embora as alterações na expressão do mRNA que codifica uma proteína não reflitam necessariamente em alterações comparáveis no nível da proteína correspondente, os arranjos de genes são mais sensíveis que os géis bidimensionais, principalmente com relação a proteínas pouco abundantes, e, desta maneira, podem examinar uma gama maior de produtos genéticos.

A bioinformática auxilia na identificação das funções da proteína

As funções de uma grande parcela de proteínas codificadas pelo genoma humano são atualmente desconhecidas. O desenvolvimento de arranjos ou *chips* de proteína para testar diretamente as

funções potenciais das proteínas em uma escala de massa permanece em seus primórdios. Contudo, recentes avanços na bioinformática permitem que os pesquisadores comparem sequências de aminoácidos para descobrir indícios para as propriedades, papéis fisiológicos e mecanismos de ação potenciais das proteínas. Os algoritmos exploram a tendência da natureza para empregar variações de um tema estrutural para realizar funções similares em várias proteínas [p. ex., a dobra de ligação de nucleotídeo de Rossmann para ligar o NAD(P)H, sequências de direcionamento nuclear e mãos EF para ligar o Ca^{2+}]. Esses domínios geralmente são detectados na estrutura primária por meio da conservação de determinados aminoácidos em posições principais. As opiniões sobre propriedades e o papel fisiológico de uma proteína recentemente descoberta podem ser assim deduzidas ao se comparar sua estrutura primária com aquela das proteínas conhecidas.

RESUMO

- Os polímeros de aminoácidos ou polipeptídeos longos constituem a unidade estrutural básica das proteínas e a estrutura de uma proteína fornece percepções sobre como ela preenche suas funções.
- As proteínas sofrem alterações pós-tradução durante sua vida, as quais influenciam sua função e determinam seu destino.
- O método de Edman foi substituído em grande parte pela MS, um instrumento sensível e versátil para determinar a estrutura primária, identificar as modificações pós-tradução e detectar as anormalidades metabólicas.
- A clonagem de DNA e a biologia molecular juntamente com a química da proteína propiciam uma conduta híbrida que aumenta muito a velocidade e a eficiência para a determinação das estruturas primárias das proteínas.
- A genômica – a análise da totalidade da sequência do oligonucleotídeo do material genético completo de um organismo – proporcionou conhecimentos adicionais.
- Os algoritmos de computador facilitam a identificação de ORFs que codificam uma determinada proteína ao usar as sequências parciais e o perfil de massa peptídica para pesquisar as bases de dados de sequências.
- Atualmente, os cientistas estão tentando determinar a sequência primária e o papel funcional de toda proteína expressa em uma célula viva, conhecidas como seu proteoma.
- Uma meta importante é a identificação das proteínas e de suas modificações pós-tradução, cujo aparecimento ou desaparecimento se correlaciona com fenômenos fisiológicos, envelhecimento ou doenças específicas.

REFERÊNCIAS

Arnaud CH: Mass spec tackles proteins. Chem Eng News 2006;84:17.

Austin CP: The impact of the completed human genome sequence on the development of novel therapeutics for human disease. Annu Rev Med 2004;55:1.

Deutscher MP (editor): *Guide to Protein Purification.* Methods Enzymol, vol. 182, Academic Press, 1990 (Entire volume).

Gwynne P, Heebner G: Mass spectrometry in drug discovery and development: from physics to pharma. Science 2006;313:1315.

Kislinger T, Gramolini AO, MacLennan DH, et al: Multidimensional protein identification technology (MudPIT): technical overview of a profiling method optimized for the comprehensive proteomic investigation of normal and diseased heart tissue. J Am Soc Mass Spectrom 2005;16:1207.

Kolialexi A, Anagnostopoulos AK, Mavrou A, et al: Application of proteomics for diagnosis of fetal aneuploidies and pregnancy complications. J Proteomics 2009;72:731.

Levy PA: An overview of newborn screening. J Dev Behav Pediatr 2010;31:622.

Schena M, Shalon D, Davis RW, et al: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science 1995;270:467.

Scopes RK: *Protein Purification. Principles and Practice*, 3rd ed. Springer, 1994.

Semsarian C, Seidman CE: Molecular medicine in the 21st century. Intern Med J 2001;31:53.

Sharon M, Robinson CV: The role of mass spectrometry in structure elucidation of dynamic protein complexes. Annu Rev Biochem 2007;76:167.

Shendure J, Ji H: Next-generation DNA sequencing. Nature Biotechnol 2008; 26:1135.

Sikaroodi M, Galachiantz Y, Baranova Al: Tumor markers: the potential of "omics" approach. Curr Mol Med 2010;10:249.

Woodage T, Broder S: The human genome and comparative genomics: understanding human evolution, biology, and medicine. J Gastroenterol 2003;15:68.

CAPÍTULO 5

Proteínas: Ordens de Estrutura Superiores

Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Indicar as vantagens e desvantagens de diversas condutas para classificar as proteínas.
- Explicar e ilustrar as estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das proteínas.
- Identificar os principais tipos de estrutura secundária reconhecidos e explicar os motivos supersecundários.
- Descrever o tipo e as forças relativas das forças que estabilizam cada ordem de estrutura da proteína.
- Descrever as informações sumarizadas por um gráfico de Ramachandran.
- Indicar o atual conhecimento relativo ao processo pelo qual se acredita que as proteínas atinjam a sua conformação original.
- Identificar os papéis fisiológicos na maturação das proteínas chaperonas, da proteína dissulfeto isomerase e da peptidilprolina *cis-trans*-isomerase.
- Descrever as principais técnicas biofísicas utilizadas para estudar as estruturas terciária e quaternária das proteínas.
- Explicar como os distúrbios genéticos e nutricionais da maturação do colágeno ilustram a ligação próxima entre a função e a estrutura da proteína.
- Para as doenças por príon, delinear os eventos globais na patologia molecular e nomear as formas de vida que elas afetam.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Na natureza, a forma segue a função. A fim de que um polipeptídeo recentemente sintetizado amadureça em uma proteína biologicamente funcional capaz de catalisar uma reação metabólica, empreender o movimento celular ou formar os bastões e os cabos macromoleculares que proporcionam a integridade estrutural de pelos, ossos, tendões e dentes, ele deve dobrar-se em um arranjo tridimensional específico, ou **conformação**. Além disso, durante a maturação, as **modificações pós-tradução** podem acrescentar novos grupamentos químicos ou remover segmentos do peptídeo transitoriamente necessários. As deficiências genéticas ou nutricionais que comprometem a maturação proteica são deletérias à saúde. Exemplos das primeiras incluem a doença de Creutzfeldt-Jakob, encefalopatia espongiforme ovina, doença de Alzheimer e a encefalopatia espongiforme bovina ("doença da vaca louca"). O escorbuto representa uma deficiência nutricional que compromete a maturação da proteína.

CONFORMAÇÃO *VERSUS* CONFIGURAÇÃO

Os termos configuração e conformação são frequentemente confundidos. A **configuração** refere-se à relação geométrica entre um determinado conjunto de átomos, por exemplo, aqueles que diferenciam os L-aminoácidos dos D-aminoácidos. A interconversão das alternativas de *configuração* requer a ruptura (e reformatação) das ligações covalentes. A **conformação** refere-se à relação espacial de cada átomo em uma molécula. A interconversão entre os confôrmeros ocorre sem ruptura da ligação covalente, com retenção da configuração, geralmente por meio da rotação em torno de ligações simples.

AS PROTEÍNAS ERAM INICIALMENTE CLASSIFICADAS POR SUAS CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

A princípio, os cientistas abordavam as relações estrutura-função nas proteínas ao separá-las em classes baseadas em propriedades como solubilidade, forma ou pela presença de grupamentos não proteicos. Por exemplo, as proteínas que podem ser extraídas das células com o uso de soluções aquosas de pH fisiológico e força iônica são classificadas como **solúveis**. A extração de **proteínas integrantes de membrana** requer a dissolução da membrana com detergentes. As **proteínas globulares** são moléculas aparentemente esféricas e compactas, que apresentam **proporções axiais** (a proporção entre suas dimensões mais curta e mais longa) não superiores a 3. A maioria das enzimas é composta por proteínas globulares. Em contrapartida, muitas proteínas estruturais adotam conformações altamente estendidas. Essas **proteínas fibrosas** possuem proporções axiais de 10 ou mais.

As **lipoproteínas** e as **glicoproteínas** contêm lipídeos e carboidratos ligados de forma covalente, respectivamente. A mioglobina, a hemoglobina, os citocromos e muitas outras **metaloproteínas** contêm íons metálicos firmemente associados. Embora esquemas de classificação mais exatos tenham emergido com base na similaridade, ou **homologia**, na sequência de aminoácidos e na estrutura tridimensional muitos termos de classificação antigos permanecem em uso.

AS PROTEÍNAS SÃO CONSTRUÍDAS COM O EMPREGO DE PRINCÍPIOS MODULARES

As proteínas realizam complexas funções físicas e catalíticas ao posicionar grupamentos químicos específicos em um arranjo tridimensional específico. O esqueleto polipeptídico contendo esses grupamentos deve adotar uma conformação que seja funcionalmente eficiente e fisicamente forte. À primeira vista, a biossíntese dos polipeptídeos compostos por dezenas de milhares de átomos individuais pareceria ser extremamente desafiadora. Quando considerado que um polipeptídeo típico pode adotar $\geq 10^{50}$ conformações distintas, o dobramento na conformação adequada para a sua função biológica pareceria ser ainda mais trabalhoso. Conforme descrito nos Capítulos 3 e 4, a síntese dos esqueletos polipeptídicos das proteínas emprega um pequeno grupo de módulos ou blocos de construção comuns, os aminoácidos, unidos por uma ligação comum, a ligação peptídica. De forma similar, um trajeto modular por etapas simplifica o dobramento e o processamento dos polipeptídeos recentemente sintetizados em proteínas maduras.

AS QUATRO ORDENS DA ESTRUTURA DA PROTEÍNA

A natureza modular da síntese e do dobramento da proteína está incorporada no conceito das ordens da estrutura da proteína: **estrutura primária** – a sequência de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica; **estrutura secundária** – o dobramento de segmentos curtos (3 a 30 resíduos) contíguos do polipeptídeo em unidades geometricamente ordenadas; **estrutura terciária** – a reunião das unidades estruturais secundárias em unidades funcionais maiores como o polipeptídeo maduro e seus domínios componentes; e **estrutura quaternária** – o número e os tipos de unidades polipeptídicas de proteínas oligoméricas e seus arranjos espaciais.

ESTRUTURA SECUNDÁRIA

As ligações peptídicas restringem as conformações secundárias possíveis

A rotação livre é possível em torno de apenas duas das três ligações covalentes da estrutura polipeptídica: a ligação do carbono α (Cα) ao carbono da carbonila (Co) e a ligação do Cα ao nitrogênio (Figura 3-4). O caráter de dupla ligação parcial da ligação peptídica que liga o Co ao nitrogênio α exige que o carbono da carbonila, o oxigênio da carbonila e o nitrogênio α permaneçam coplanares, impedindo assim a rotação. O ângulo entre a ligação Cα−N é denominado ângulo phi (Φ) e aquele entre a ligação Co−Cα é o ângulo psi (Ψ). Para aminoácidos diferentes da glicina, não é permitida a maioria das combinações dos ângulos phi e psi devido ao impedimento estérico (**Figura 5-1**). As conformações da prolina são ainda mais restritivas devido à ausência da rotação livre da ligação N−Cα.

As regiões de estrutura secundária ordenada originam-se quando uma série de resíduos aminoacil adota ângulos phi e psi similares. Os segmentos estendidos do polipeptídeo (p. ex., al-

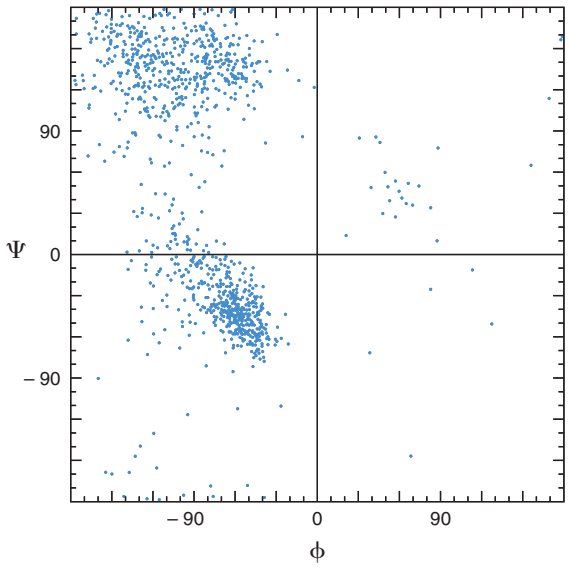


FIGURA 5-1 Gráfico de Ramachandran dos ângulos phi (Φ) e psi (Ψ) da cadeia principal para aproximadamente 1.000 resíduos não glicina em oito proteínas cujas estruturas foram solucionadas em alta resolução. Os pontos representam as combinações permissíveis, e os espaços representam as combinações proibidas dos ângulos phi e psi. (Reproduzida, com autorização, de Richardson JS: The anatomy and taxonomy of protein structures. Adv Protein Chem 1981; 34:167. Copyright © 1981. Reimpressa com a autorização da Elsevier.)

ças) podem possuir uma variedade desses ângulos. Os ângulos que definem os dois tipos mais comuns de estrutura secundária, a **hélice α** e a **folha β**, caem dentro dos quadrantes esquerdos inferior e superior de um gráfico de Ramachandran, respectivamente (Figura 5-1).

Hélice α

O esqueleto polipeptídico de uma hélice α é torcido por uma quantidade igual de cada carbono α com um ângulo phi de aproximadamente −57° e um ângulo psi de aproximadamente −47°. Uma volta completa da hélice contém em média 3,6 resíduos aminoacil, e a distância pela qual se eleva em cada volta (seu *passo*) é de 0,54 nm (**Figura 5-2**). Os grupamentos R de cada resíduo aminoacil em uma hélice α ficam voltados para fora (**Figura 5-3**). As proteínas contêm apenas L-aminoácidos, para os quais uma hélice α virada para a direita é muito mais estável, e apenas as hélices α viradas para a direita estão presentes nas proteínas. Os diagramas esquemáticos das proteínas representam as hélices α como molas ou cilindros.

A estabilidade de uma hélice α se origina principalmente das pontes de hidrogênio formadas entre o oxigênio da carbonila da ligação peptídica e o átomo de hidrogênio da ligação peptídica do nitrogênio do quarto resíduo adiante na cadeia polipeptídica (**Figura 5-4**). A capacidade de formar um número máximo de pontes de hidrogênio, suplementadas pelas interações de van der Waals no núcleo dessa estrutura firmemente posicionada,

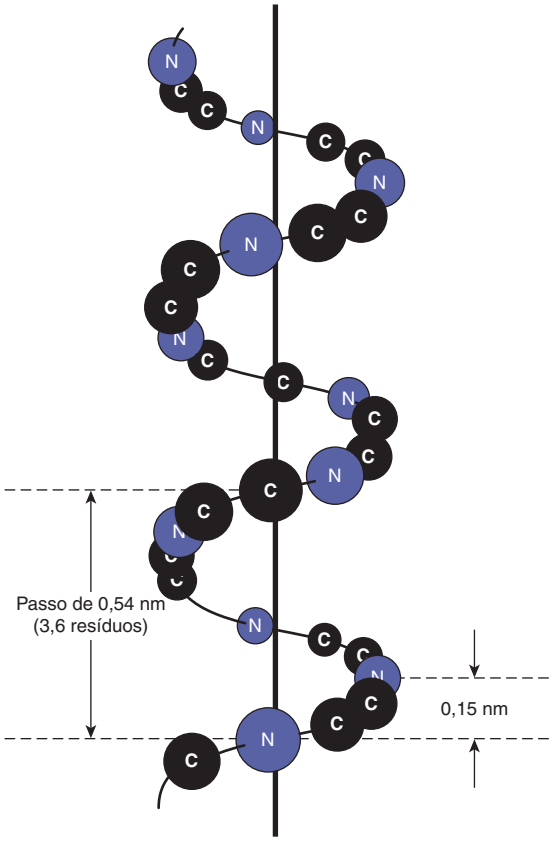


FIGURA 5-2 Orientação dos átomos da cadeia principal de um peptídeo em torno do eixo de uma hélice α.

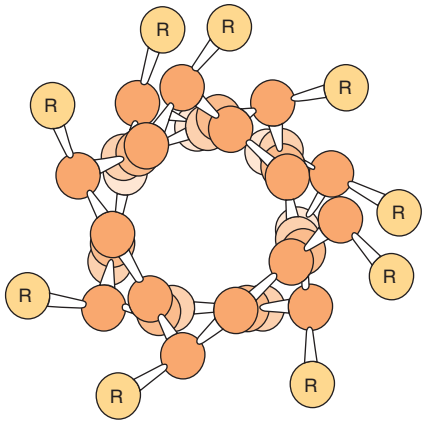


FIGURA 5-3 Visualização de cima para baixo do eixo de uma hélice α. As cadeias laterais (R) estão no exterior da hélice. Os raios de van der Waals dos átomos são maiores que os aqui demonstrados; portanto, quase não há espaço dentro da hélice. (Ligeiramente modificada e reproduzida, com autorização, de Stryer L: *Biochemistry*, 3rd ed. Freeman, 1988. Copyright © 1999 W. H. Freeman and Company.)

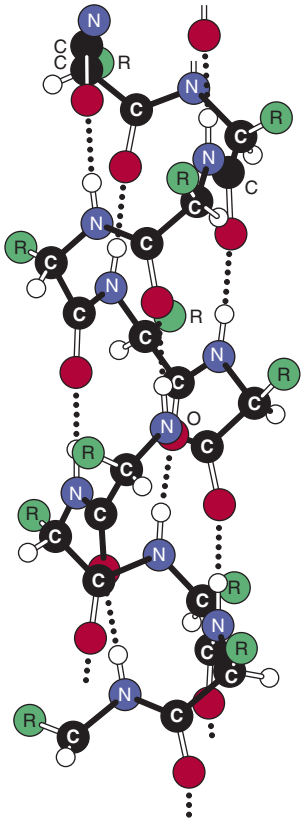


FIGURA 5-4 As pontes de hidrogênio (linhas pontilhadas) formadas entre os átomos de H e O estabilizam um polipeptídeo em uma conformação α-helicoidal. (Reimpressa, com autorização, de Haggis GH, et al, (1964), *"Introduction to Molecular Biology"*. Science 146:1455-1456. Reimpressa com autorização da AAAS.)

proporciona a força de direcionamento termodinâmico de uma hélice α. Como o nitrogênio da ligação peptídica da prolina carece de um átomo de hidrogênio para contribuir com uma ponte de hidrogênio, a prolina somente pode ser acomodada de modo estável dentro da primeira volta de uma hélice α. Devido a seu tamanho pequeno, a glicina frequentemente também induz as curvaturas nas hélices α.

Muitas hélices α possuem grupamentos R predominantemente hidrofóbicos em um lado do eixo da hélice e grupamentos predominantemente hidrofílicos no outro. Essas **hélices anfipáticas** estão bem adaptadas à formação de interfaces entre regiões polares e apolares, como o interior hidrofóbico de uma proteína e seu ambiente aquoso. Os agrupamentos de hélices anfipáticas podem criar um canal, ou poro, que permite que moléculas polares específicas atravessem as membranas celulares hidrofóbicas.

Folha β

A segunda estrutura secundária regular reconhecível (por isso o "beta") nas proteínas é a folha β. Os resíduos de aminoácido de uma folha β, quando visualizados na borda, formam um padrão de zigue-zague ou pregueado no qual os grupamentos R dos resíduos adjacentes apontam em direções opostas. Ao contrário da estrutura compacta da hélice α, o esqueleto peptídico da folha β é altamente estendido. Contudo, como a hélice α, as folhas β derivam grande parte de sua estabilidade a partir das pontes de hidrogênio entre os oxigênios da carbonila e os hidrogênios da amida das ligações peptídicas. No entanto, comparadas à hélice α, essas pontes são formadas com os segmentos adjacentes da folha β (**Figura 5-5**).

As folhas β interatuantes podem ser dispostas para formar uma folha β **paralela**, na qual os segmentos adjacentes da cadeia polipeptídica prosseguem na mesma direção amino para carboxila, ou para formar uma folha **antiparalela**, na qual prosseguem na direção oposta (Figura 5-5). Ambas as configurações permitem o número máximo de pontes de hidrogênio entre os segmentos, ou filamentos, da folha. A maioria das folhas β não é perfeitamente plana, mas tende a apresentar uma torção para a direita. Os agrupamentos de filamentos torcidos da folha β formam o núcleo de muitas proteínas globulares (**Figura 5-6**). Os diagramas esquemáticos representam as folhas β como setas que apontam na direção do aminoterminal para a carboxila terminal.

Alças e dobras

Quase metade dos resíduos em uma proteína globular típica reside em hélices α ou folhas β, e metade em alças, curvaturas, dobras e outros aspectos conformacionais estendidos. Dobras e curvaturas referem-se aos segmentos curtos de aminoácidos que unem duas unidades da estrutura secundária, como os dois filamentos adjacentes de uma folha β antiparalela. Uma curvatura β envolve quatro resíduos aminoacil, na qual o primeiro resíduo está ligado por hidrogênio ao quarto, resultando em uma curvatura estreita de 180° (**Figura 5-7**). Com frequência, a prolina e a glicina estão presentes nas curvaturas β.

As alças são regiões que contêm resíduos além da quantidade mínima necessária para conectar regiões adjacentes da estrutura secundária. Com conformação irregular, as alças servem, no entanto, a importantes papéis biológicos. Para muitas enzimas, as alças que fazem ponte entre os domínios responsáveis por ligar substratos frequentemente contêm resíduos aminoacil que participam na catálise. Os **motivos de hélice-alça-hélice** proporcionam a porção de ligação de oligonucleotídeo de muitas proteínas de ligação do DNA, como repressores e fatores de transcrição. Os motivos estruturais como o motivo hélice-alça-hélice, os quais são intermediários na escala entre as estruturas secundárias e terciárias, são frequentemente denominados de **estruturas supersecundárias**. Como muitas alças e dobras residem na superfície das proteínas e, desta maneira, são expostas ao solvente, elas constituem sítios prontamente acessíveis, ou **epítopos**, para o reconhecimento e para a ligação de anticorpos.

Embora as alças careçam de regularidade estrutural aparente, muitas adotam uma conformação específica estabilizada por meio de pontes de hidrogênio, pontes salinas e interações hidrofóbicas com outras porções da proteína. No entanto, nem todas as porções das proteínas são necessariamente ordenadas. As proteínas podem conter regiões "desordenadas", geralmente na extremidade aminoterminal ou carboxilaterminal, caracterizadas pela alta flexibilidade conformacional. Em muitos casos, essas regiões desordenadas assumem uma conformação ordena-

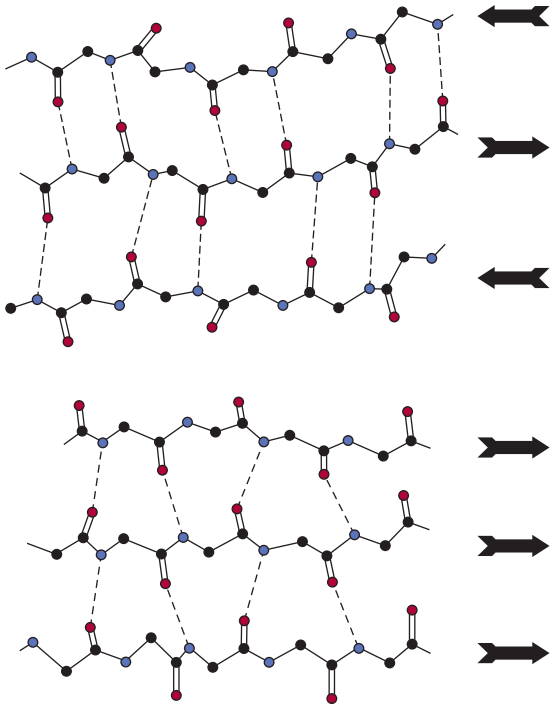


FIGURA 5-5 Espaçamento e ângulos de ligação das pontes de hidrogênio de folhas β pregueadas antiparalelas e paralelas. As setas indicam a direção de cada filamento. As pontes de hidrogênio estão indicadas por linhas pontilhadas com os átomos de nitrogênio α participantes (doadores de hidrogênio) e átomos de oxigênio (aceptores de hidrogênio) mostrados em azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de carbono do esqueleto são mostrados em preto. Para a clareza da apresentação, os grupamentos R e os átomos de hidrogênio são omitidos. *Acima:* Folha β antiparalela. Os pares de pontes de hidrogênio alternam-se entre estar muito próximos entre si e amplamente separados e apresentam orientação quase perpendicular ao esqueleto do polipeptídeo. *Abaixo:* Folha β paralela. As pontes de hidrogênio são uniformemente espaçadas, mas se inclinam em direções alternadas.

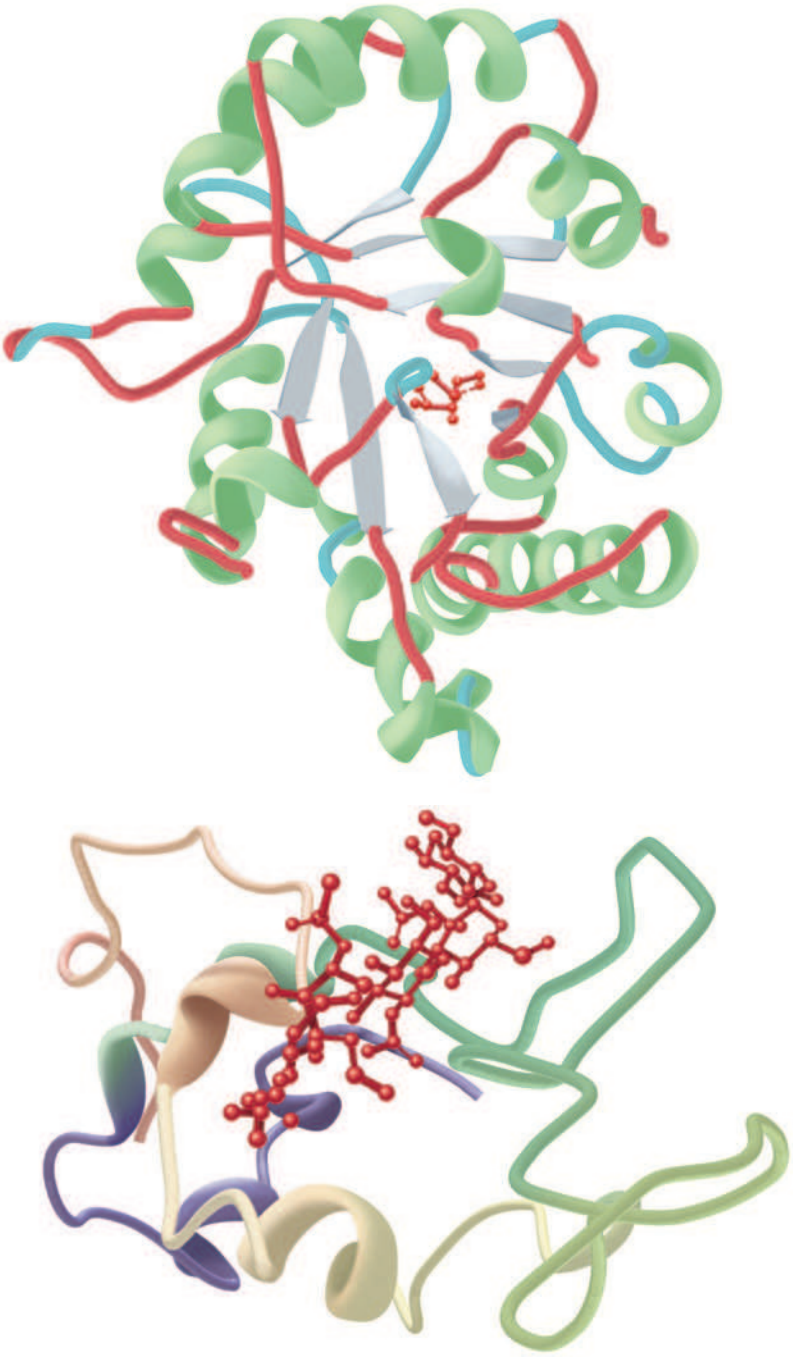


FIGURA 5-6 Exemplos da estrutura terciária das proteínas. Acima: a enzima triose fosfato isomerase forma complexo com o substrato análogo 2-fosfoglicerato (vermelho). Observe o arranjo elegante e assimétrico de folhas β (azul-claro) e hélices α (verde) alternantes, com as folhas β formando o núcleo em barril β circundado pelas hélices. (Adaptada de Protein Data Bank ID n° 1°5x.) Embaixo: a lisozima forma complexo com o substrato análogo penta-N-acetil quitopentaose (vermelho). A cor da cadeia polipeptídica é graduada ao longo do espectro visível desde o roxo (N-terminal) até o bege (C-terminal). Observe como a forma côncava do domínio forma uma bolsa de ligação para o pentassacarídeo, a falta de folha β e a alta proporção de alças e curvas. (Adaptada de Protein Data Bank ID n° 1sfb.)

da perante a ligação com um ligante. Essa flexibilidade estrutural capacita essas regiões a agir como comutadores controlados por ligantes que afetam a estrutura e a função da proteína.

Estrutura terciária e quaternária

O termo "estrutura terciária" refere-se à totalidade da conformação tridimensional de um polipeptídeo. Ele indica, no espaço tridimensional, como as características estruturais secundárias – hélices, folhas, dobras, curvaturas e alças – se reúnem para formar domínios e como esses domínios se relacionam espacialmente entre si. Um **domínio** é uma seção da estrutura da proteína suficiente para realizar determinada tarefa química ou física, como a ligação de um substrato ou de outro ligante. A maioria dos domínios é de natureza modular, sendo contígua na sequência primária e no espaço tridimensional (**Figura 5-8**). As proteínas simples, principalmente aquelas que interagem com um único substrato, como a lisozima ou a triose fosfato isomerase (Figura 5-6) e a proteína de armazenamento de oxigênio mioglobina (Capítulo 6), muitas vezes consistem em um único domínio. Em contrapartida, a desidrogenase lática é composta de dois domínios, um domínio N-terminal de ligação do NAD^+ e um domínio de ligação C-terminal para o segundo substrato, o piruvato (Figura 5-8). A desidrogenase lática é um componen-

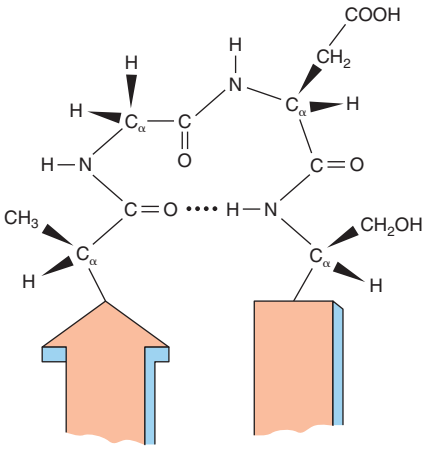


FIGURA 5-7 Uma curvatura β que liga dois segmentos de folha β antiparalela. A linha pontilhada indica a ponte de hidrogênio entre o primeiro e o quarto aminoácidos do segmento de quatro resíduos Ala-Gly-Asp-Ser.

te da família das oxidorredutases que compartilha um domínio de ligação N-terminal do $NAD(P)^+$ comum conhecido como a **dobra de Rossmann**. Ao fundir o domínio da dobra de Rossmann com vários domínios C-terminais, surgiu uma grande família de oxidorredutases que utilizam o $NAD(P)^+$/NAD(P)H para a oxidação e redução de uma ampla gama de metabólitos. Os exemplos incluem desidrogenase alcoólica, glutaraldeído-3-fosfato desidrogenase, malato desidrogenase, quinona oxidorredutase, 6-fosfogluconato desidrogenase, D-glicerato desidrogenase, formato desidrogenase e 3α, 20β-hidroxiesteroide desidrogenase.

Nem todos os domínios se ligam a substratos. Os domínios de membrana hidrofóbicos ancoram proteínas nas membranas ou possibilitam que elas abram as membranas. As sequências de localização direcionam as proteínas para posições subcelulares ou extracelulares específicas como o núcleo, a mitocôndria, as vesículas secretoras, etc. Os domínios reguladores deflagram alterações na função da proteína em resposta à ligação de efetores alostéricos ou modificações covalentes (Capítulo 9). A combinação de módulos de domínio proporciona uma via fácil para produzir proteínas de grande complexidade estrutural e sofisticação funcional (**Figura 5-9**).

As proteínas contendo múltiplos domínios também podem ser reunidas por meio da associação de múltiplos polipeptídeos ou protômeros. A estrutura quaternária define a composição polipeptídica de uma proteína e, para uma proteína oligomérica, as relações espaciais entre seus protômeros ou subunidades. As proteínas **monoméricas** consistem em uma cadeia polipeptídica; as proteínas **diméricas** contêm duas cadeias polipeptídicas; os **homodímeros** contêm duas cópias da mesma cadeia polipeptídica, enquanto os polipeptídeos diferem em um **heterodímero**. As letras gregas (α, β, γ, etc.) são utilizadas para distinguir subunidades diferentes de uma proteína heteroligomérica, e os subscritos indicam o número de cada tipo de subunidade. Por exemplo, α_4 designa uma proteína homotetramérica, e a proteína $\alpha_2\beta_2\gamma$ tem cinco subunidades de três tipos diferentes.

Mesmo que as pequenas proteínas contenham muitos milhares de átomos, as ilustrações da estrutura da proteína que indicam a posição de cada átomo geralmente são muito complexas para ser prontamente interpretadas. Desta maneira, os diagramas esquemáticos simplificados são utilizados para demonstrar as características principais das estruturas terciária e quaternária de uma proteína. Os diagramas em fita (Figuras 5-6 e 5-8) traçam a conformação do esqueleto polipeptídico, com os cilindros e as setas indicando as regiões de uma hélice α e de uma folha β, respectivamente. Em uma representação ainda mais simples, os segmentos em linha que ligam os carbonos α indicam o trajeto do esqueleto polipeptídico. Esses diagramas esquemáticos com frequência incluem as cadeias laterais de aminoácidos selecionados que enfatizam as relações de estrutura-função específicas.

MÚLTIPLOS FATORES ESTABILIZAM AS ESTRUTURAS TERCIÁRIA E QUATERNÁRIA

As ordens superiores da estrutura da proteína são estabilizadas principalmente – e, em geral, de maneira exclusiva – por meio de interações não covalentes. Dentre estas, as principais são as interações hidrofóbicas, que direcionam a maioria das cadeias de aminoácidos laterais hidrofóbicas para o interior da proteína, protegendo-as da água. Os outros contribuintes significativos incluem as pontes de hidrogênio e as pontes salinas entre os carboxilatos dos ácidos aspártico e glutâmico e as cadeias laterais de resíduos de lisil, argininil e histidil protonados com cargas opostas. Embora individualmente fracas em relação a uma típica ligação covalente de 80 a 120 kcal/mol, coletivamente essas inúmeras interações conferem um alto grau de estabilidade para a conformação biologicamente funcional de uma proteína, assim como um fecho do tipo velcro contém a força cumulativa de uma imensidão de diminutas alças e ganchos de plástico.

Algumas proteínas contêm pontes dissulfeto covalentes que ligam os grupamentos sulfidrila dos resíduos cisteinil. A formação de pontes dissulfeto envolve a oxidação de grupamentos sulfidrila cisteinil e exige oxigênio. As pontes dissulfeto intrapolipeptídicas aumentam a estabilidade da conformação dobrada de um peptídeo, enquanto as pontes dissulfeto interpolipeptídicas estabilizam a estrutura quaternária de determinadas proteínas oligoméricas.

A ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL É DETERMINADA POR CRISTALOGRAFIA POR RAIOS X OU POR ESPECTROSCOPIA RM

Cristalografia por raios X

Após a solução, em 1960, por John Kendrew da estrutura tridimensional da mioglobina, a cristalografia por raios X revelou as estruturas de milhares de macromoléculas biológicas, variando desde as proteínas até muitos oligonucleotídeos e alguns vírus. Para a resolução de sua estrutura por meio da cristalografia por

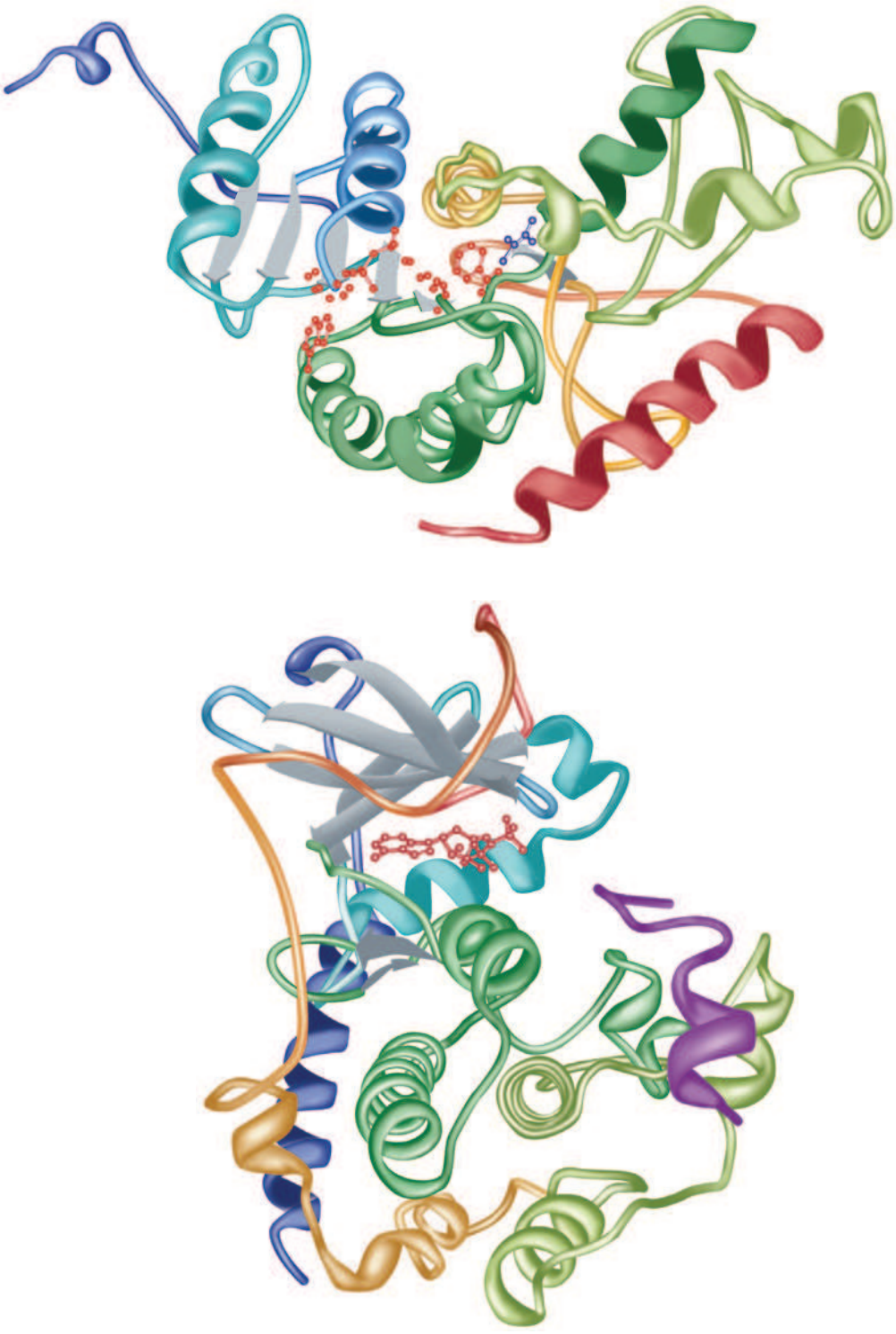


FIGURA 5-8 Polipeptídeos contendo dois domínios. Acima: é demonstrada a estrutura tridimensional de uma unidade monomérica da enzima tetramérica lactato desidrogenase com os substratos NADH (vermelho) e piruvato (azul) ligados. Nem todas as ligações no NADH são exibidas. A cor da cadeia polipeptídica é graduada ao longo do espectro visível desde o azul (N-terminal) até o cor de laranja (C-terminal). Observe como a porção N-terminal do polipeptídeo forma um domínio contíguo, englobando a porção esquerda da enzima, responsável por ligar o NADH. De maneira similar, a porção C-terminal forma um domínio contíguo responsável por ligar o piruvato. (Adaptada de Protein Data Bank ID n° 3ldh.) Embaixo: é mostrada a estrutura tridimensional da subunidade catalítica da proteinoquinase dependente do AMPc (Capítulo 42) com os substratos análogos ADP (vermelho) e peptídeo (roxo) ligados. A cor da cadeia polipeptídica é graduada ao longo do espectro visível desde o azul (N-terminal) até a cor de laranja (C-terminal). As proteinoquinases transferem o grupamento γ-fosfato do ATP para a proteína e os substratos peptídicos (Capítulo 9). Observe como a porção N-terminal do polipeptídeo forma um domínio contíguo rico em folha β que liga o ADP. De forma similar, a porção C-terminal forma um domínio rico em hélice α contíguo, responsável pela ligação do substrato peptídico. (Adaptada de Protein Data Bank ID n° 1jbp.)

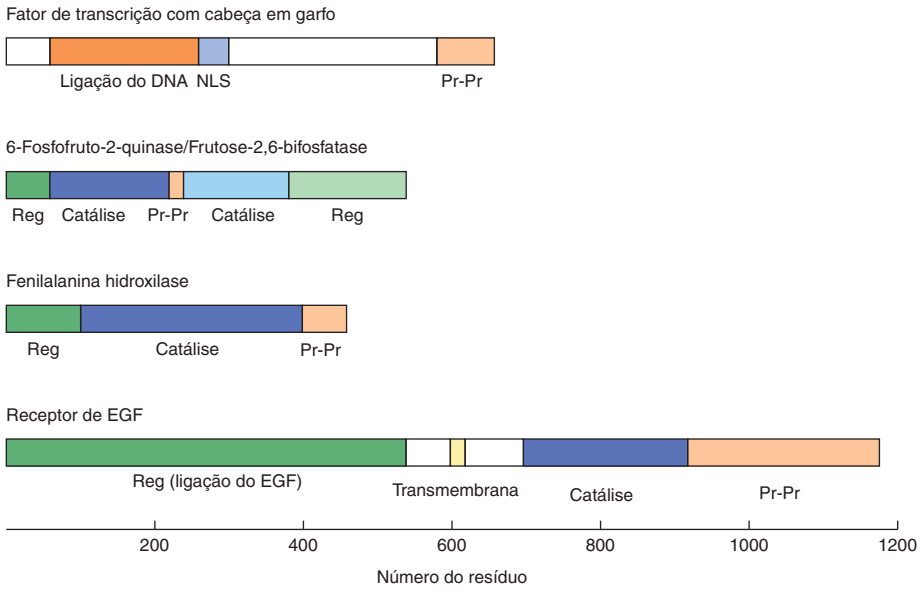


FIGURA 5-9 Algumas proteínas com multidomínios. Os retângulos representam as sequências polipeptídicas de um fator de transcrição com extremidade em garfo; 6-fosfofruto-2-quinase/frutose-2,6-bifosfatase, uma enzima bifuncional cujas atividades são controladas de maneira recíproca por efetores alostéricos e modificação covalente (Capítulo 20); fenilalanina-hidroxilase (Capítulos 27 e 29), cuja atividade é estimulada por fosforilação de seu domínio regulador; e o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF) (Capítulo 41), uma proteína transmembrana cujo domínio da proteinoquinase intracelular é regulada por meio da ligação do hormônio peptídico EGF com o seu domínio extracelular. Os domínios reguladores são coloridos em verde, os domínios catalíticos em azul-escuro e azul-claro, os domínios de interação proteína-proteína em cor de laranja claro, os domínios de ligação do DNA em laranja escuro, as sequências de localização nuclear em azul médio, e os domínios de transmembrana em amarelo. As atividades de quinase e bifosfatase da 6-fosfofruto-2-quinase/frutose-2,6-bifosfatase são catalisadas pelos domínios catalíticos N-e C-terminais próximos, respectivamente.

raios X, primeiramente uma proteína é precipitada sob condições que formam grandes cristais bem ordenados. Para estabelecer as condições apropriadas, os estudos de cristalização empregam alguns microlitros da solução da proteína e uma matriz de variáveis (temperatura, pH, presença de sais ou solutos orgânicos como polietileno glicol) para estabelecer as condições ótimas para a formação do cristal. Os cristais montados em capilares de quartzo são primeiramente irradiados com raios X monocromáticos com comprimento de onda aproximado de 0,15 nm para obter-se a confirmação de que eles são proteicos, não sais. Os cristais de proteína podem ser então congelados no nitrogênio líquido para subsequente coleta do conjunto de dados de alta resolução. Os padrões formados pelos raios X que sofrem difração pelos átomos em suas trajetórias são registrados em uma placa fotográfica ou em seu equivalente computadorizado como um padrão circular de manchas de intensidade variável. Os dados inerentes nessas manchas são então analisados com o uso de uma abordagem matemática denominada *síntese de Fourier*, que soma as funções de onda. As amplitudes de onda estão relacionadas com a intensidade da mancha, mas como as ondas não estão em fase, a relação entre suas etapas deve ser determinada em seguida.

A conduta tradicional para a solução do "problema de fase" emprega a **substituição isomórfica**. Previamente à irradiação, um átomo com uma "assinatura" radiográfica distinta é introduzido em um cristal em posições conhecidas na estrutura primária da proteína. Em geral, a substituição isomórfica de átomo pesado utiliza o mercúrio ou o urânio, que se ligam a resíduos de cisteína. Uma conduta alternativa emprega a expressão de proteínas recombinantes codificadas por plasmídeo, nas quais o selênio substitui o enxofre da metionina. A expressão emprega um hospedeiro bacteriano auxotrófico para a biossíntese da metionina e um meio definido em que a selenometionina substitui a metionina. De forma alternativa, quando a estrutura desconhecida é similar a uma que já foi solucionada, a **substituição molecular** em um modelo existente proporciona uma maneira atrativa para formar a fase dos dados sem o emprego de átomos pesados. Por fim, os resultados do faseamento e das somas de Fourier propiciam um perfil de densidade de elétron ou um mapa tridimensional de como os átomos se conectam ou estão relacionados entre si.

Cristalografia por raios X de Laue

A capacidade de algumas enzimas cristalizadas para catalisar as reações químicas sugere fortemente que as estruturas determinadas pela cristalografia são, na realidade, representativas das estruturas existentes na solução livre. Contudo, a cristalografia clássica proporciona um quadro essencialmente estático de uma proteína que pode sofrer alterações estruturais significativas *in vivo*, como aquelas que acompanham a catálise enzimática. A conduta de Laue utiliza a difração dos raios X *policromáticos* e muitos cristais. O processo de rotação do cristal no feixe de raios X, o qual tem um longo período de duração, é evitado o que permite o uso de tempos de exposição extremamente curtos. A detecção dos movimentos dos resíduos ou domínios de uma enzima durante a catálise emprega cristais que contêm um análogo de substrato inativo ou "preso". Um *flash* intenso de luz visível cliva o precursor preso a fim de liberar o substrato livre e iniciar a catálise de

uma maneira controlada com precisão. Utilizando-se essa conduta, os dados podem ser coletados durante intervalos de tempo tão curtos quanto alguns nanossegundos.

Espectroscopia por ressonância magnética nuclear

A espectroscopia de ressonância magnética (RM), um poderoso complemento da cristalografia por raios X, mede a absorbância da energia eletromagnética por radiofrequência emitida por determinados núcleos atômicos. Os isótopos "RM-ativos" de elementos biologicamente relevantes incluem ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N e ^{31}P. A frequência, ou desvio químico, em que um determinado núcleo absorve a energia é uma função tanto do grupamento funcional dentro do qual ele reside, quanto da proximidade de outros núcleos RM-ativos. Outrora limitada a metabólitos e a macromoléculas relativamente pequenas, $\leq$ 30 kDa, a RM atualmente pode analisar proteínas e proteínas complexas de $>$ 100 kDa. A espectroscopia de RM bidimensional permite que a representação tridimensional de uma proteína seja construída ao se determinar a proximidade desses núcleos entre si. A espectroscopia de RM analisa as proteínas em solução aquosa. Isso não somente extingue a necessidade de formar cristais (uma vantagem em especial quando se lida com a dificuldade de cristalizar as proteínas de membranas), como possibilita a observação em tempo real das alterações na conformação que acompanham a ligação com o ligante ou à catálise. Ela também oferece a possibilidade de talvez um dia ser capaz de observar a estrutura e a dinâmica das proteínas (e dos metabólitos) dentro de células vivas.

Modelagem molecular

Um adjunto valioso para a determinação empírica da estrutura tridimensional das proteínas reside na utilização da tecnologia computadorizada para a modelagem molecular. Quando se conhece a estrutura tridimensional, os programas de **dinâmica molecular** podem ser empregados para simular a dinâmica conformacional de uma proteína e a maneira pela qual fatores como a temperatura, o pH, a força iônica ou as substituições de aminoácidos influenciam esses movimentos. Os programas de **ancoragem molecular** simulam as interações que acontecem quando uma proteína encontra um substrato, inibidor ou outro ligante. A triagem virtual para moléculas prováveis de interagir com os sítios principais em uma proteína de interesse biomédico é utilizada de forma extensa para facilitar a descoberta de novos medicamentos.

A modelagem molecular também é empregada para deduzir a estrutura das proteínas para as quais ainda não se encontra disponível as estruturas por cristalografia por raios X ou de RM. Os algoritmos de estrutura secundária avaliam a propensão de resíduos específicos para ser incorporados em hélices α ou folhas β nas proteínas previamente estudadas, de modo a predizer a estrutura secundária de outros polipeptídeos. Na **modelagem por homologia**, a estrutura tridimensional conhecida de uma proteína é usada de molde sobre o qual se ergue um modelo da *provável* estrutura de uma proteína correlata. Os cientistas estão trabalhando para idealizar programas de computador que irão predizer de forma segura a conformação tridimensional de uma proteína diretamente a partir de sua sequência primária, permitindo, assim, a determinação das estruturas de muitas proteínas desconhecidas, para as quais atualmente estão faltando os moldes.

DOBRAMENTO DA PROTEÍNA

Do ponto de vista conformacional, as proteínas são moléculas dinâmicas que podem se dobrar em sua conformação funcionalmente competente em um intervalo de tempo de milissegundos e que, com frequência, podem ser novamente dobradas quando sua conformação é rompida ou desnaturada. Como se obtêm este notável processo? O dobramento no estado nativo não envolve uma busca de todas as estruturas possíveis. As proteínas desnaturadas não são molas apenas aleatórias. Os contatos nativos são favorecidos e as regiões da estrutura original persistem mesmo no estado desnaturado. Adiante são debatidos os fatores que facilitam o dobramento e o redobramento; os conceitos e mecanismos propostos atualmente se baseiam em mais de 40 anos de experimentação em grande parte *in vitro*.

A conformação nativa de uma proteína é favorecida do ponto de vista termodinâmico

O número de combinações distintas dos ângulos phi e psi que especificam as conformações potenciais mesmo de um polipeptídeo relativamente pequeno – 15 kDa – é inacreditavelmente grande. As proteínas são orientadas por meio do vasto labirinto de possibilidades pela termodinâmica. Como a conformação biologicamente relevante – ou nativa – de uma proteína geralmente é aquela mais favorecida do ponto de vista energético, o conhecimento da conformação nativa é especificado na sequência primária. Contudo, se fosse esperado que um polipeptídeo encontrasse sua conformação nativa pela exploração aleatória de todas as possíveis conformações, o processo exigiria bilhões de anos para ser completado. Claramente, na natureza, o dobramento da proteína ocorre de maneira mais ordenada e orientada.

O dobramento é modular

Em geral, o dobramento da proteína ocorre por meio de um processo por etapas. No primeiro estágio, à medida que o polipeptídeo recentemente sintetizado emerge dos ribossomos, os segmentos curtos se dobram nas unidades estruturais secundárias que fornecem as regiões locais da estrutura organizada. O dobramento é então reduzido para a seleção de um arranjo apropriado desse número relativamente pequeno de elementos estruturais secundários. No segundo estágio, as regiões hidrofóbicas segregam-se para dentro do interior da proteína, longe do solvente, formando um "glóbulo fundido", um polipeptídeo parcialmente dobrado no qual os módulos da estrutura secundária se rearranjam até que seja atingida a conformação madura da proteína. Esse processo é ordenado, porém não rígido. Há considerável flexibilidade na maneira e na ordem em que os elementos da estrutura secundária podem ser rearranjados. Em geral, cada elemento da estrutura secundária ou da estrutura supersecundária facilita o dobramento apropriado ao direcionar o processo do dobramento no sentido da conformação nativa e para longe de alternativas improdutivas. Para as proteínas oligoméricas, cada protômero tende a se dobrar antes que se associe com outras subunidades.

As proteínas auxiliares ajudam no dobramento

Sob condições laboratoriais apropriadas, muitas proteínas irão se dobrar novamente de maneira espontânea depois de serem **desnaturadas** (ou seja, desdobradas) pelo tratamento com ácido ou base, agentes caotrópicos ou detergentes. Contudo, a recomposição do dobramento sob essas condições é lenta – minutos a horas. Além disso, muitas proteínas falham em recompor o dobramento espontaneamente *in vitro*; como alternativa, elas formam **agregados** insolúveis, complexos desordenados de polipeptídeos não dobrados ou parcialmente dobrados mantidos juntos predominantemente por interações hidrofóbicas. Os agregados representam resultados improdutivos no processo de dobramento. As células empregam proteínas auxiliares no aceleramento do processo de dobramento e na orientação no sentido de uma conclusão produtiva.

Chaperonas

As **chaperonas** participam no dobramento de mais da metade de todas as proteínas de mamíferos. A hsp70 (proteína de choque térmico de 70 kDa) da família das chaperonas liga sequências curtas de aminoácidos hidrofóbicos que emergem enquanto um novo polipeptídeo está sendo sintetizado, protegendo-o contra o solvente. As chaperonas impedem a agregação, propiciando, desta maneira, uma oportunidade para a formação dos elementos estruturais secundários apropriados e sua subsequente coalescência em um glóbulo fundido. A família hsp60 de chaperonas, por vezes chamadas de **chaperoninas**, difere em sequência e estrutura da hsp70 e seus homólogos. A hsp60 age mais adiante no processo de dobramento, frequentemente em conjunto com uma chaperona hsp70. A cavidade central da chaperona hsp60 em forma de anel proporciona um ambiente protegido no qual um polipeptídeo pode se dobrar até que todas as regiões hidrofóbicas sejam posicionadas em seu interior, prevenindo qualquer tendência no sentido da agregação.

Proteína dissulfeto isomerase

As pontes dissulfeto entre e dentro dos polipeptídeos estabilizam as estruturas terciária e quaternária. No entanto, a formação da ponte dissulfeto é inespecífica. Sob condições de oxidação, uma determinada cisteína pode formar uma ponte dissulfeto com o −SH de qualquer resíduo cisteinil acessível. Ao catalisar a troca de dissulfeto, a ruptura de uma ligação S—S e sua reformação com uma cisteína parceira diferente, a proteína dissulfeto isomerase facilita a formação de pontes dissulfeto que estabilizam a conformação nativa de uma proteína.

Prolina-*cis*, *trans*-isomerase

Todas as ligações peptídicas X-Pro – onde X representa qualquer resíduo – são sintetizadas na configuração *trans*. No entanto, dentre as ligações X-Pro de proteínas maduras, aproximadamente 6% são *cis*. A configuração *cis* é particularmente comum nas curvaturas β. A isomerização de *trans* para *cis* é catalisada pela enzima prolina-*cis*, *trans*-isomerase (**Figura 5-10**).

O dobramento é um processo dinâmico

Do ponto de vista da conformação, as proteínas são moléculas dinâmicas, as quais podem dobrar-se e desdobrar-se centenas ou milhares de vezes em sua existência. Uma vez desdobradas, como as proteínas tornam a se dobrar e restauram sua conformação funcional? Em primeiro lugar, o ato de se desdobrar raramente leva à randomização completa da cadeia polipeptídica dentro da célula. Em geral, as proteínas desdobradas retêm inúmeros contatos e regiões da estrutura secundária que facilitam o processo do retorno do dobramento. Em segundo lugar, as chaperonas podem "resgatar" as proteínas desdobradas que ficaram aprisionadas do ponto de vista termodinâmico em um extremo de dobramento errôneo, ao desdobrar as regiões hidrofóbicas e proporcionar uma segunda oportunidade para o dobramento de maneira produtiva. A glutationa pode reduzir as pontes dissulfeto inadequadas que podem ser formadas perante a exposição a agentes oxidantes como O_2, peróxido de hidrogênio ou superóxido (Capítulo 52).

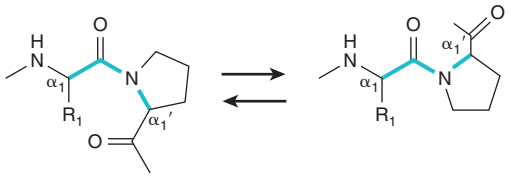


FIGURA 5-10 Isomerização da ligação peptídica *N*-α_1 prolil de uma configuração *cis* para uma configuração *trans* em relação ao esqueleto do polipeptídeo.

A PERTURBAÇÃO DA CONFORMAÇÃO DA PROTEÍNA PODE TER CONSEQUÊNCIAS PATOLÓGICAS

Príons

As encefalopatias espongiformes transmissíveis, ou **doenças por príons**, são doenças neurodegenerativas fatais caracterizadas por alterações espongiformes, gliomas astrocíticos e perda neuronal decorrente da deposição de agregados proteicos insolúveis nas células nervosas. Elas incluem a doença de Creutzfeldt-Jakob em humanos, a encefalopatia espongiforme em ovelhas (*scrapie*) e a encefalopatia espongiforme bovina (doença da vaca louca) no gado. Uma forma variante da doença de Creutzfeldt-Jakob (vCJD), que aflige os pacientes mais jovens, está associada a transtornos psiquiátricos e comportamentais de início precoce. As doenças por príons podem se manifestar como distúrbios infecciosos, genéticos ou esporádicos. Como nenhum gene viral ou bacteriano que codifica a proteína patológica do príon pode ser identificado, a origem e o mecanismo de transmissão da doença por príon permanecem não elucidados.

Atualmente, há o reconhecimento de que as doenças por príons são doenças da conformação da proteína transmitidas ao se modificar a conformação, e, por conseguinte, as propriedades físicas, das proteínas endógenas ao hospedeiro. A proteína relacionada com príon (PrP) humano, uma glicoproteína codificada no braço curto do cromossomo 20, normalmente é monomérica e rica em hélice α. As proteínas de príon patogênicas servem de moldes para a transformação conformacional da PrP normal, conhecida como PrPc, em PrPsc. A PrPsc é rica em folhas β com muitas cadeias laterais com aminoacil hidrofóbico expostas ao solvente. À medida que se forma a nova molécula de PrPsc, ela

deflagra a produção de variantes ainda mais patológicas em uma reação em cadeia conformacional. Como as moléculas de PrPsc se associam firmemente entre si por meio de suas regiões hidrofóbicas expostas, as unidades de PrPsc que se acumulam coalescem para formar agregados insolúveis resistentes à protease. Como um príon patológico ou proteína relacionada com o príon pode servir como molde para a transformação conformacional de muitas vezes o seu número de moléculas de PrPc, as doenças por príon podem ser transmitidas pela proteína isolada sem o envolvimento do DNA ou RNA.

Doença de Alzheimer

O redobramento ou o dobramento errôneo de outra proteína endógena ao tecido cerebral humano, o β-amiloide, é um aspecto proeminente da doença de Alzheimer. Embora a causa principal da doença de Alzheimer permaneça desconhecida, as placas senis e feixes neurofibrilares característicos contêm agregados da proteína β-amiloide, um polipeptídeo de 4,3 kDa produzido pela clivagem proteolítica de uma proteína maior conhecida como proteína precursora do amiloide. Nos pacientes com doença de Alzheimer, os níveis de β-amiloide se tornam elevados, e essa proteína sofre uma transformação conformacional a partir de um estado solúvel, rico em hélice α, para um estado rico em folhas β e propenso à autoagregação. A apolipoproteína E foi implicada como um mediador potencial dessa transformação conformacional.

β-talassemias

As talassemias são causadas por defeitos genéticos que comprometem a síntese de uma das subunidades polipeptídicas da hemoglobina (Capítulo 6). Durante o surto de síntese da hemoglobina que acontece durante o desenvolvimento do eritrócito, uma chaperona específica chamada de proteína de estabilização da hemoglobina α (AHSP) se liga às subunidades α da hemoglobina que aguardam a incorporação no multímero da hemoglobina. Na ausência dessa chaperona, as subunidades α da hemoglobina livres se agregam, e o precipitado resultante possui efeitos citotóxicos sobre o eritrócito em desenvolvimento. As pesquisas que utilizam o camundongo geneticamente modificado sugerem um papel para a AHSP na modulação da gravidade da β-talassemia nos seres humanos.

O COLÁGENO ILUSTRA O PAPEL DO PROCESSAMENTO PÓS-TRADUÇÃO NA MATURAÇÃO DA PROTEÍNA

A maturação da proteína frequentemente envolve produzir e clivar as ligações covalentes

A maturação das proteínas em seu estado estrutural final geralmente envolve a clivagem ou a formação (ou ambas) de ligações covalentes, um processo de **modificação pós-tradução**. Muitos polipeptídeos são inicialmente sintetizados como precursores maiores chamados de **pró-proteínas**. Os segmentos polipeptídicos "extras" nessas pró-proteínas muitas vezes servem como sequências líderes que direcionam um polipeptídeo para uma determinada organela ou facilitam sua passagem através de uma membrana. Os outros segmentos garantem que a atividade potencialmente danosa de uma proteína, como as proteases tripsina e quimotripsina, permaneça inibida até que essas proteínas alcancem sua destinação final. No entanto, quando esses requisitos transitórios são preenchidos, as novas regiões supérfluas do peptídeo são removidas pela proteólise seletiva. Outras modificações covalentes podem acontecer, as quais adicionam novas funcionalidades químicas a uma proteína. A maturação do colágeno ilustra esses dois processos.

O colágeno é uma proteína fibrosa

O colágeno é a mais abundante dentre as proteínas fibrosas que constituem mais de 25% da massa proteica no corpo humano. As outras proteínas fibrosas proeminentes incluem a queratina e a miosina. Essas proteínas fibrosas representam uma fonte primária de força estrutural para as células (p. ex., o citoesqueleto) e tecidos. A pele deriva sua força e flexibilidade de uma rede entremeada de fibras de colágeno e queratina, enquanto os dentes e os ossos são sustentados por uma rede subjacente de fibras de colágeno análoga aos filamentos de aço no concreto reforçado. O colágeno também está presente nos tecidos conectivos, como ligamentos e tendões. O alto grau de força tênsil necessário para preencher esses papéis estruturais requer proteínas alongadas caracterizadas por sequências repetitivas de aminoácidos e uma estrutura secundária regular.

O colágeno forma uma tripla-hélice única

O tropocolágeno, a unidade repetitiva de uma fibra de colágeno madura, consiste em três polipeptídeos de colágeno, cada qual contendo aproximadamente 1.000 aminoácidos, mantido em conjunto em uma configuração ímpar, a tripla-hélice do colágeno (**Figura 5-11**). Uma fibra de colágeno madura forma um bastão alongado com uma relação axial de aproximadamente 200. Três filamentos polipeptídicos entrelaçados, que se torcem para a esquerda, enrolam-se um sobre o outro no sentido da direita para formar a tripla-hélice do colágeno. O sentido opositor para a direita dessa super-hélice e seus polipeptídeos componentes tornam a tripla-hélice do colágeno altamente resistente ao desenrolar – princípio também aplicado aos cabos de aço de pontes em suspensão. Uma tripla-hélice de colágeno possui 3,3 resíduos por volta e um aumento por resíduo em quase duas vezes aquele de uma hélice α. Os grupamentos R de cada filamento polipeptídico da tripla-hélice se agrupam tão intimamente que, de modo a se

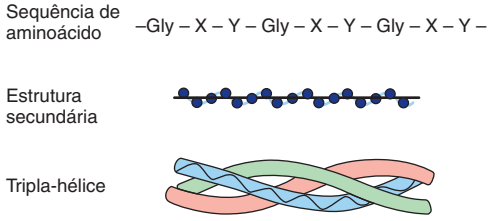


FIGURA 5-11 As estruturas primária, secundária e terciária do colágeno.

adaptar, um em cada três deve conter H. Desta maneira, cada terceiro resíduo de aminoácido no colágeno é um resíduo de glicina. A coordenação dos três filamentos propicia o posicionamento apropriado das glicinas necessárias por toda a hélice. O colágeno também é rico em prolina e hidroxiprolina, proporcionando um padrão Gly-X-Y repetitivo (Figura 5-11), no qual, geralmente, o Y é a prolina ou a hidroxiprolina.

As hélices triplas do colágeno são estabilizadas por pontes de hidrogênio entre os resíduos em *diferentes* cadeias polipeptídicas, processo ajudado pelos grupamentos hidroxila dos resíduos hidroxiprolil. A estabilidade adicional é fornecida por ligações cruzadas covalentes formadas entre resíduos lisil modificados, tanto dentro quanto entre as cadeias polipeptídicas.

O colágeno é sintetizado como um precursor maior

Inicialmente, o colágeno é sintetizado como um polipeptídeo precursor maior, o pró-colágeno. Inúmeros resíduos prolil e lisil do pró-colágeno são hidroxilados pela prolil-hidroxilase e pela lisil-hidroxilase, enzimas que exigem o ácido ascórbico (vitamina C; ver Capítulos 27 e 44). Os resíduos hidroxiprolil e hidroxilisil proporcionam a capacidade de realizar pontes de hidrogênio adicionais que estabilizam a proteína madura. Além disso, as glicosil e galactosil transferases prendem resíduos de glicosil ou galactosil nos grupamentos hidroxila de resíduos hidroxilisil específicos.

A porção central do polipeptídeo precursor então se associa a outras moléculas para formar a tripla-hélice característica. Esse processo é acompanhado pela remoção do aminoterminal globular e das extensões carboxila-terminais do polipeptídeo precursor por meio da proteólise seletiva. Determinados resíduos lisil são modificados pela lisil-oxidase, uma proteína contendo cobre que converte os grupamentos ε-amino em aldeídos. Os aldeídos podem sofrer uma aldol condensação para formar uma dupla ligação C=C ou uma base de Schiff (eneimina) com o grupamento ε-amino de um resíduo lisil não modificado, a qual é subsequentemente reduzida para formar uma ligação simples C−N. Essas ligações covalentes fazem ligação cruzada com os polipeptídeos individuais e conferem à fibra uma força e rigidez excepcionais.

Os distúrbios nutricionais e genéticos podem prejudicar a maturação do colágeno

A complexa série de eventos na maturação do colágeno propicia um modelo que ilustra as consequências biológicas da maturação polipeptídica incompleta. O defeito mais bem conhecido na biossíntese do colágeno é o escorbuto, consequência de uma deficiência nutricional de vitamina C necessária pelas prolil e lisil-hidroxilases. O déficit resultante no número de resíduos de hidroxiprolina e hidroxilisina corroe a estabilidade conformacional das fibras de colágeno, levando a gengivas hemorrágicas, edema das articulações, cura deficiente das feridas e, por fim, à morte. Caracterizada por pelos encaracolados e retardo do crescimento, a síndrome de Menkes reflete uma deficiência nutricional do cobre necessário pela lisil oxidase, a qual catalisa uma etapa primordial na formação das ligações cruzadas covalentes que fortalecem as fibras de colágeno.

Os distúrbios genéticos da biossíntese do colágeno incluem diversas formas de osteogênese imperfeita, caracterizada por ossos frágeis. Na síndrome de Ehlers-Danlos, um grupo de distúrbios do tecido conectivo que envolve a integridade comprometida das estruturas de sustentação, os defeitos nos genes que codificam o colágeno-1 α, pró-colágeno *N*-peptidase, ou lisil-hidroxilase resultam em articulações móveis e anormalidades cutâneas (ver também o Capítulo 48).

RESUMO

- As proteínas podem ser classificadas com base em sua solubilidade, forma ou função ou na presença de um grupamento prostético, como a heme.
- A estrutura primária codificada de um polipeptídeo pelo gene é a sequência de seus aminoácidos. Sua estrutura secundária resulta do dobramento dos polipeptídeos em motivos ligados por hidrogênio, como a hélice α, a folha β pregueada, as curvaturas β e as alças. As combinações destes motivos podem formar os motivos supersecundários.
- A estrutura terciária relaciona-se com as relações entre os domínios estruturais secundários. A estrutura quaternária das proteínas com dois ou mais polipeptídeos (proteínas oligoméricas) diz respeito às relações espaciais entre os vários tipos de polipeptídeos.
- As estruturas primárias são estabilizadas por ligações peptídicas covalentes. As ordens superiores de estrutura são estabilizadas por forças fracas – múltiplas pontes de hidrogênio, pontes salinas (eletrostáticas) e pela associação de grupamentos R hidrofóbicos.
- O ângulo phi (Φ) de um polipeptídeo é o ângulo ao redor da ligação C_α—N; o ângulo psi (Ψ) é aquele em torno da ligação C_α—C_o. A maioria das combinações dos ângulos phi-psi não é admitida devido ao seu impedimento estérico. Os ângulos phi-psi que formam a hélice α e a folha β caem dentro dos quadrantes esquerdos inferior e superior de um gráfico de Ramachandran, respectivamente.
- O dobramento da proteína é um processo pouco compreendido. Em termos gerais, os segmentos curtos do polipeptídeo recentemente sintetizado se dobram nas unidades estruturais secundárias. As forças que protegem as regiões hidrofóbicas contra o solvente direcionam então o polipeptídeo parcialmente dobrado para um "glóbulo fundido", no qual os módulos da estrutura secundária são rearranjados para conferir a conformação nativa da proteína.
- As proteínas que ajudam o dobramento incluem a proteína dissulfeto isomerase, prolina-*cis*,*trans*-isomerase e as chaperonas que participam no dobramento de mais da metade das proteínas de mamíferos. As chaperonas protegem os polipeptídeos recentemente sintetizados contra o solvente e proporcionam um ambiente para que os elementos da estrutura secundária apareçam e coalesçam nos glóbulos fundidos.
- A cristalografia por raios X e a RM são as principais técnicas utilizadas para estudar as ordens superiores da estrutura da proteína.
- Os príons – partículas de proteína que carecem de ácido nucleico – causam encefalopatias espongiformes fatais

transmissíveis como a doença de Creutzfeldt-Jakob, a encefalopatia espongiforme de ovelhas (*scrapie*) e a encefalopatia espongiforme bovina. As doenças por príon envolvem uma estrutura secundária-terciária alterada de uma proteína de ocorrência natural, a PrPc. Quando a PrPc interage com sua isoforma patológica PrPSc, sua conformação é transformada a partir de uma estrutura predominantemente α-helicoidal para a estrutura folha β característica do PrPSc.

- O colágeno ilustra a ligação próxima entre a estrutura da proteína e a função biológica. As doenças da maturação do colágeno incluem a síndrome de Ehlers-Danlos e a doença de deficiência de vitamina C escorbuto.

REFERÊNCIAS

Caughey B, Baron GS, Chesebro B, et al: Getting a grip on prions: oligomers, amyloids, and pathological membrane interactions. Annu Rev Biochem 2009;78:177.

Chiti F, Dobson CM: Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. Annu Rev Biochem 2006;75:519.

Foster MP, McElroy CA, Amero CD: Solution NMR of large molecules and assemblies. Biochemistry 2007;46:331.

Gothel SF, Marahiel MA: Peptidyl-prolyl *cis–trans* isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. Cell Mol Life Sci 1999;55:423.

Hardy J: Toward Alzheimer therapies based on genetic knowledge. Annu Rev Med 2004;55:15.

Hartl FU, Hayer-Hartl M: Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. Nat Struct Biol 2009;16:574.

Ho BK, Thomas A, Brasseur R: Revisiting the Ramachandran plot: hard-sphere repulsion, electrostatics, and H-bonding in the α-helix. Protein Sci 2003;12:2508.

Hristova K, Wimley WC, Mishra VK, et al: An amphipathic alpha-helix at a membrane interface: a structural study using a novel X-ray diffraction method. J Mol Biol 1999;290:99.

Irani DN, Johnson RT: Diagnosis and prevention of bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt–Jakob disease. Annu Rev Med 2003;54:305.

Jorgensen WL: The many roles of computation in drug discovery. Science 2004;303:1813.

Khare SD, Dokholyan NV: Molecular mechanisms of polypeptide aggregation in human disease. Curr Protein Pept Sci 2007;8:573.

Kim J, Holtzman DM: Prion-like behavior of amyloid-ß. Science 2010;330:918.

Kong Y, Zhou S, Kihm AJ, et al: Loss of alpha-hemoglobin-stabilizing protein impairs erythropoiesis and exacerbates beta-thalassemia. J Clin Invest 2004;114:1457.

Myllyharju J: Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis. Matrix Biol 2003;22:15.

Rider MH, Bertrand L, Vertommen D, et al: 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. Biochem J 2004;381:561.

Shoulders MD, Raines RT: Collagen structure and stability. Annu Rev Biochem 2009; 78:929.

Stoddard BL, Cohen BE, Brubaker M, et al: Millisecond Laue structures of an enzyme-product complex using photocaged substrate analogs. Nat Struct Biol 1998;5:891.

Wegrzyn RD, Deuerling E: Molecular guardians for newborn proteins: ribosome-associated chaperones and their role in protein folding. Cellular Mol Life Sci 2005;62:2727.

Young JC, Moarefi I, Hartl FU: *Hsp*90: a specialized but essential protein-folding tool. J Cell Biol 2001;154:267.

CAPÍTULO

6

Proteínas: Mioglobina e Hemoglobina

Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever as semelhanças e as diferenças estruturais mais importantes entre a mioglobina e a hemoglobina.
- Esboçar as curvas de ligação para a oxigenação da mioglobina e hemoglobina.
- Identificar as ligações covalentes e outras associações próximas entre o heme e a globina na oximioglobina e na oxi-hemoglobina.
- Explicar por que a função fisiológica da hemoglobina requer que sua curva de ligação de O_2 seja sigmoidal em vez de hiperbólica.
- Elucidar o papel de um ambiente oculto sobre a capacidade da hemoglobina para se ligar ao monóxido de carbono.
- Definir P_{50} e indicar seu significado no transporte e na liberação de oxigênio.
- Referir as alterações estruturais e conformacionais na hemoglobina que acompanham sua oxigenação e subsequente desoxigenação.
- Relatar o papel do 2,3-bifosfoglicerato (BPG) na ligação e liberação de oxigênio.
- Delinear o papel da hemoglobina no transporte de CO_2 e próton, e descrever as alterações acompanhantes no pK_a do grupamento imidazólio relevante.
- Caracterizar as consequências estruturais para a HbS decorrentes da diminuição da pO_2.
- Identificar o defeito metabólico que acontece como consequência das α e β-talassemias.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

As proteínas heme mioglobina e hemoglobina mantêm um suprimento de oxigênio essencial para o metabolismo oxidativo. A mioglobina, uma proteína monomérica do músculo vermelho, armazena oxigênio como uma reserva contra a sua privação. A hemoglobina, uma proteína tetramérica dos eritrócitos, transporta o O_2 até os tecidos e retorna com CO_2 e prótons para os pulmões. O cianeto e o monóxido de carbono provocam a morte porque rompem a função fisiológica das proteínas heme citocromo oxidase e hemoglobina, respectivamente. A estrutura secundária-terciária das subunidades da hemoglobina assemelha-se à mioglobina. No entanto, a estrutura tetramérica da hemoglobina permite interações cooperativas que são centrais para sua função. Por exemplo, o 2,3-BPG promove a liberação eficiente do O_2 ao estabilizar a estrutura quaternária da desoxi-hemoglobina. A hemoglobina e a mioglobina ilustram tanto as relações de estrutura-função da proteína quanto a base molecular das doenças genéticas como a doença falciforme e as talassemias.

O HEME E O FERRO FERROSO CONFEREM A CAPACIDADE DE ARMAZENAR E TRANSPORTAR OXIGÊNIO

A mioglobina e a hemoglobina contêm **heme**, um tetrapirrol cíclico que consiste em quatro moléculas de pirrol ligadas por pontes de metina. Essa rede planar de duplas ligações conjugadas absorve a luz visível e colore o heme em vermelho intenso. Os substitutos nas posições β do heme são os grupamentos metil (M), vinil (V) e propionato (Pr) dispostos na ordem, M, V, M, V, M, Pr, Pr, M (**Figura 6-1**). O átomo de ferro ferroso (Fe^{2+}) reside no centro do tetrapirrol planar. As outras proteínas com grupamentos prostéticos tetrapirrólicos contendo metal incluem os citocromos (Fe e Cu) e clorofila (Mg) (ver Capítulo 31). A oxidação e a redução dos átomos Fe e Cu dos citocromos são essenciais para suas funções biológicas como transportadores de elétrons. Em contrapartida, a oxidação do

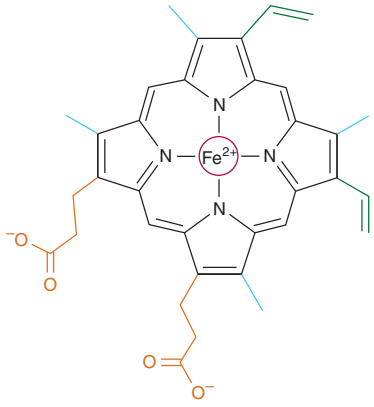


FIGURA 6-1 Heme. Os anéis pirrólicos e os carbonos da ponte de metileno são coplanares, e o átomo de ferro (Fe^{2+}) encontra-se quase no mesmo plano. A quinta e a sexta posições de coordenação do Fe^{2+} são diretamente perpendiculares – e diretamente acima e abaixo – do plano do anel do heme. Observe a natureza dos grupamentos substitutos metil (azul), vinil (verde) e propionato (cor de laranja) nos carbonos β dos anéis pirrólicos, o átomo de ferro central (vermelho) e a localização do lado polar do anel do heme (na posição equivalente a 7 horas) que se defronta com a superfície da molécula de mioglobina.

Fe^{2+} da mioglobina ou da hemoglobina em Fe^{3+} destrói sua atividade biológica.

A mioglobina é rica em hélice α

O oxigênio armazenado na mioglobina do músculo é liberado durante a privação de O_2 (p. ex., exercício intenso) para uso nas mitocôndrias musculares para a síntese aeróbia de ATP (ver Capítulo 13). Um polipeptídeo com 153 resíduos aminoacil (PM 17000), a mioglobina dobra-se em uma forma compacta que mede 4,5 × 3,5 × 2,5 nm (**Figura 6-2**). Uma proporção incomumente alta, cerca de 75%, dos resíduos está presente nas oito hélices α de 7 a 20 resíduos direcionadas para a direita. Começando no aminoterminal, essas são denominadas hélices de A a H. Sendo típico das proteínas globulares, a superfície da mioglobina é rica em aminoácidos que comportam cadeias laterais polares e potencialmente carregadas, enquanto – com apenas duas exceções – o interior contém apenas resíduos como Leu, Val, Phe e Met, os quais possuem grupamentos R não polares. As exceções são a His E7 e a His F8, o sétimo e o oitavo resíduos nas hélices E e F, que se localizam próximo ao ferro heme, onde funcionam na ligação de O_2.

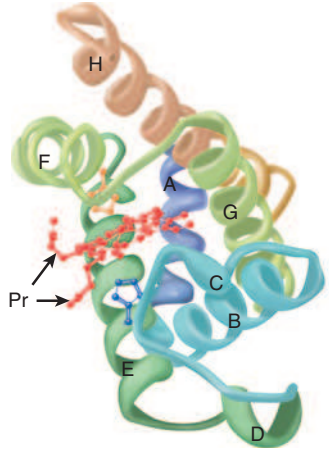


FIGURA 6-2 Estrutura tridimensional da mioglobina. O esqueleto polipeptídico da mioglobina é demonstrado em um diagrama em fita. A cor da cadeia polipeptídica é graduada ao longo do espectro visível, desde o azul (N-terminal) até o bronze (C-terminal). O grupamento prostético heme é vermelho. As regiões α-helicoidais são designadas de A a H. Os resíduos de histidina distal (E7) e proximal (F8) são destacados em azul e cor de laranja, respectivamente. Observe como os substitutos propionato (Pr) polares se projetam para fora do heme no sentido do solvente. (Adaptada de Protein Data Bank ID nº 1a6n.)

As histidinas F8 e E7 realizam funções únicas na ligação de oxigênio

O heme da mioglobina localiza-se em uma fissura entre as hélices E e F, orientado com seus grupamentos propionatos polares voltados para a superfície da globina (Figura 6-2). O restante reside no interior não polar. A quinta posição de coordenação do ferro é ocupada por um nitrogênio do anel imidazólico da **histidina proximal**, His F8. A **histidina distal**, His E7, localiza-se no lado do anel do heme oposto à His F8.

O ferro movimenta-se no sentido do plano do heme quando o oxigênio está ligado

O ferro da mioglobina não oxigenada localiza-se a 0,03 nm (0,3 Å) fora do plano do anel do heme, no sentido da His F8. Portanto, o heme "enruga" ligeiramente. Quando o O_2 ocupa a sexta posição de coordenação, o ferro move-se para dentro 0,01 nm (0,1 Å) do plano do anel do heme. A oxigenação da mioglobina é, dessa forma, acompanhada pelo movimento do ferro, da His F8 e dos resíduos ligados à His F8.

A apomioglobina fornece um ambiente oculto para o ferro do heme

Quando o O_2 se liga à mioglobina, a ligação entre o primeiro átomo de oxigênio e o Fe^{2+} é perpendicular ao plano do anel do heme. A ligação que une o primeiro e o segundo átomos de oxigênio localiza-se em um ângulo de 121° com o plano do heme, orientando o segundo oxigênio para longe da histidina distal (**Figura**

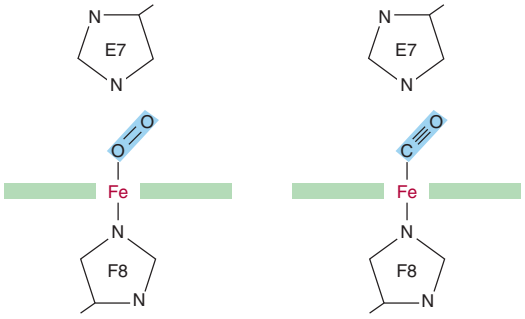


FIGURA 6-3 Ângulos para a ligação do oxigênio e monóxido de carbono (CO) com o ferro do heme da mioglobina. A histidina E7 distal impede a ligação do CO no ângulo preferido (90°) em relação ao plano do anel do heme.

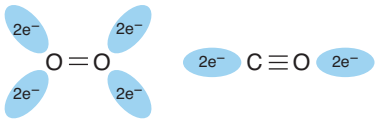


FIGURA 6-4 Orientação dos pares de elétrons isolados em relação às ligações O=O e C=O de oxigênio e monóxido de carbono. No oxigênio molecular, a formação da dupla ligação entre os dois átomos de oxigênio é facilitada pela adoção de um estado de hibridização sp^2 pelo elétron da valência de cada átomo de oxigênio. Como consequência, os dois átomos da molécula de oxigênio e cada par de elétrons isolado são coplanares e separados por um ângulo de quase 120º (esquerda). Em contrapartida, os dois átomos do monóxido de carbono são unidos por uma ligação tripla, a qual requer que os átomos de carbono e oxigênio adotem um estado de hibridização sp. Neste estado, os pares de elétrons isolados e as ligações triplas estão dispostos de uma maneira linear, onde eles são separados por um ângulo de 180º (direita).

6-3, à esquerda). Isso possibilita a sobreposição máxima entre o ferro e um dos pares isolados de elétrons nos átomos de oxigênio hibridizados em sp^2, os quais se situam em um ângulo de quase 120º com o eixo da dupla ligação O=O (**Figura 6-4**, à esquerda). O heme isolado liga-se ao monóxido de carbono (CO) com força 25.000 vezes maior que o oxigênio. Como o CO está presente em pequenas quantidades na atmosfera e origina-se nas células a partir do catabolismo do heme, por que é que o CO não desloca totalmente o O_2 do ferro do heme? A explicação aceita é que as apoproteínas da mioglobina e da hemoglobina criam um **ambiente oculto**. Quando o CO se liga ao heme isolado, todas as três formas (Fe, C e O) se situam perpendicularmente ao plano do heme. Essa geometria maximiza a sobreposição entre o par isolado de elétrons no oxigênio hibridizado sp da molécula de CO e o ferro Fe^{2+} (Figura 6-4, à direita). No entanto, na mioglobina e na hemoglobina, a histidina distal impede estericamente essa orientação de alta afinidade preferida do CO, mas não aquela do O_2. A ligação em um ângulo menos favorecido reduz a forçada ligação heme-CO para aproximadamente 200 vezes aquela da ligação heme-O_2 (Figura 6-3, à direita), em cujo nível domina o grande excesso de O_2 em relação ao CO normalmente existente. Apesar disso, cerca de 1% da mioglobina comumente se apresenta combinada com o CO.

AS CURVAS DE DISSOCIAÇÃO DE OXIGÊNIO PARA A MIOGLOBINA E A HEMOGLOBINA SE ADEQUAM ÀS SUAS FUNÇÕES FISIOLÓGICAS

Por que a mioglobina não é apropriada como uma proteína de transporte de O_2, mas se adapta bem para o armazenamento de O_2? A relação entre a concentração ou pressão parcial de O_2 (pO_2) e a quantidade de O_2 ligado é expressa como uma curva isotérmica de saturação de O_2 (**Figura 6-5**). A curva de ligação de oxigênio para a mioglobina é hiperbólica. Portanto, a mioglobina carrega prontamente o O_2 na pO_2 do leito capilar pulmonar (100 mmHg). Contudo, como a mioglobina libera apenas uma pequena fração de seu O_2 ligado nos valores da pO_2 comumente encontrados no músculo ativo (20 mmHg) ou outros tecidos (40 mmHg), ela representa um veículo ineficaz para a liberação de O_2. Quando o

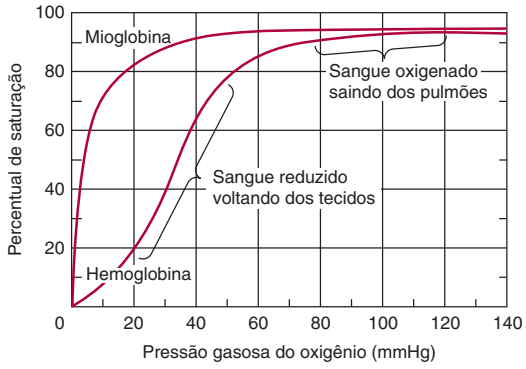


FIGURA 6-5 Curvas de ligação de oxigênio da hemoglobina e mioglobina. A pressão de oxigênio arterial é de aproximadamente 100 mmHg; a pressão de oxigênio venoso é de aproximadamente 40 mmHg; a pressão de oxigênio capilar (muscular ativo) é de aproximadamente 20 mmHg; e a pressão de oxigênio mínima necessária para a citocromo-oxidase é de aproximadamente 5 mmHg. A associação das cadeias em uma estrutura tetramérica (hemoglobina) resulta em liberação muito maior de oxigênio, a qual seria possível com as cadeias simples. (Modificada, com autorização, de Scriver CR et al (editors): *The Molecular and Metabolic Bases of Inherited Disease,* 7th ed. McGraw-Hill, 1995.)

exercício extenuante diminui a PO_2 do tecido muscular até aproximadamente 5 mmHg, a mioglobina libera o O_2 para a síntese mitocondrial do ATP, permitindo a atividade muscular continuada.

AS PROPRIEDADES ALOSTÉRICAS DAS HEMOGLOBINAS RESULTAM DE SUAS ESTRUTURAS QUATERNÁRIAS

As propriedades de cada hemoglobina são consequências de suas estruturas secundária, terciária e quaternária. A estrutura quaternária da hemoglobina confere nítidas propriedades adicionais, ausentes a partir da mioglobina monomérica, as quais a adaptam a seus papéis biológicos únicos. Além disto, as propriedades **alostéricas** (do grego *allos,* outro; *steros,* espaço) da hemoglobina proporcionam um modelo para a compreensão das outras proteínas alostéricas (ver Capítulo 18).

A hemoglobina é tetramérica

As hemoglobinas são tetrâmeros compostos de pares de duas subunidades polipeptídicas diferentes (**Figura 6-6**). As letras gregas são empregadas para designar o tipo de cada subunidade. As composições das subunidades das principais hemoglobinas são $\alpha_2\beta_2$ (HbA; a hemoglobina adulta normal), $\alpha_2\gamma_2$ (HbF; hemoglobina fetal), $\alpha_2\beta^S_2$ (HbS; hemoglobina falciforme) e $\alpha_2\delta_2$ (HbA_2; uma hemoglobina adulta menor). As estruturas primárias das cadeias β, γ e δ da hemoglobina humana são altamente conservadas.

A mioglobina e as subunidades β da hemoglobina compartilham estruturas secundárias e terciárias quase idênticas

Apesar das diferenças no tipo e número de aminoácidos presentes, a mioglobina e o polipeptídeo β da hemoglobina A possuem

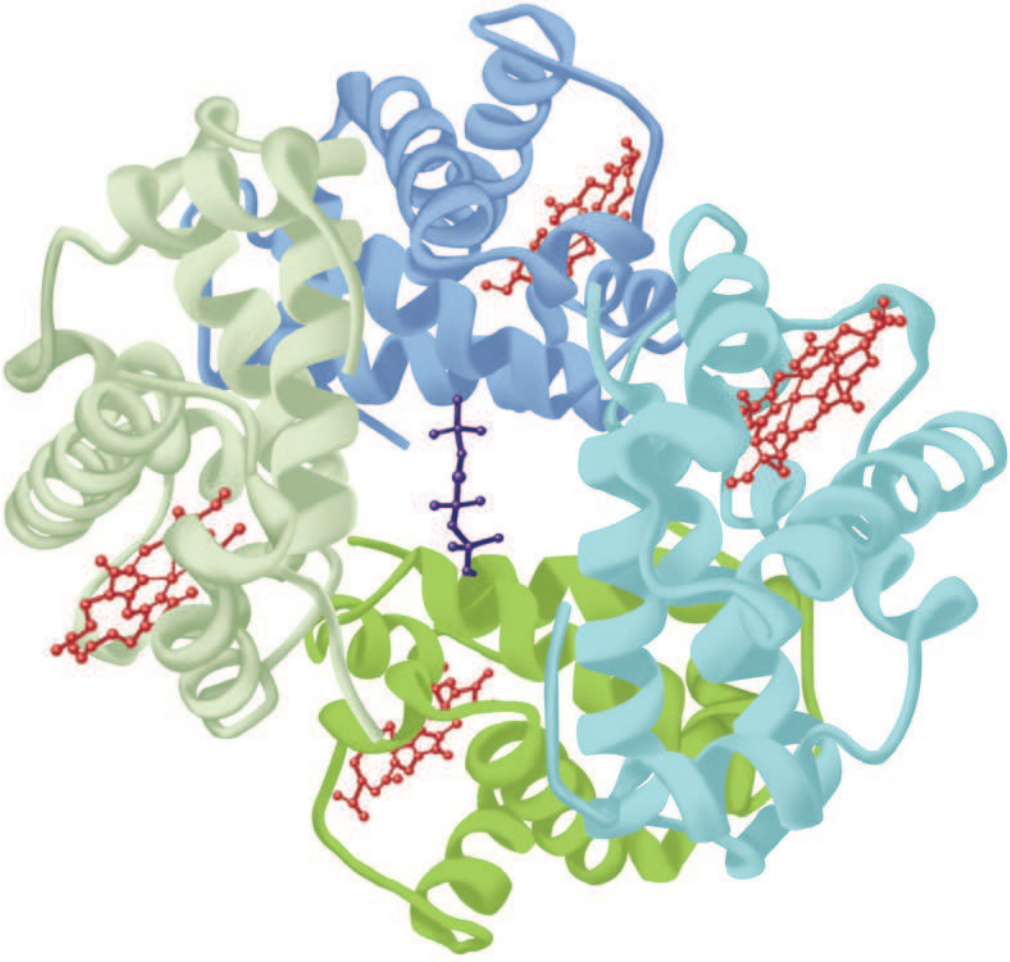


FIGURA 6-6 Hemoglobina. É mostrada a estrutura tridimensional da desoxi-hemoglobina com uma molécula de 2,3-bifosfoglicerato (azul-escuro) ligada. As duas subunidades α são coloridas em tons mais escuros de verde e azul, as duas subunidades β em tons mais claros de verde e azul, e os grupamentos prostéticos heme em vermelho. (Adaptada de Protein Data Bank ID nº 1b86.)

estruturas secundárias e terciárias quase idênticas. As semelhanças incluem a localização do heme e a das regiões helicoidais, bem como a presença de aminoácidos com propriedades similares em localizações comparáveis. Embora possua sete regiões helicoidais em lugar de oito, o polipeptídeo α da hemoglobina também se assemelha muito à mioglobina.

A oxigenação da hemoglobina deflagra as alterações conformacionais na apoproteína

As hemoglobinas ligam quatro moléculas de O_2 por tetrâmero e uma por heme. Uma molécula de O_2 liga-se a um tetrâmero da hemoglobina com maior facilidade quando outras moléculas de O_2 já estão ligadas (Figura 6-5). Denominada **ligação cooperativa**, este fenômeno permite que a hemoglobina maximize tanto a quantidade de O_2 carregada na pO_2 dos pulmões quanto a quantidade de O_2 liberada na pO_2 dos tecidos periféricos. As interações cooperativas, uma propriedade exclusiva das proteínas multiméricas, são criticamente importantes para a vida aeróbia.

A P_{50} expressa as afinidades relativas das diferentes hemoglobinas para o oxigênio

A quantidade da P_{50}, uma medida da concentração de O_2, é a pressão parcial de O_2 que satura pela metade uma determinada hemoglobina. Dependendo do organismo, a P_{50} irá variar muito, porém, em todos os exemplos, ela irá superar a pO_2 dos tecidos periféricos. Por exemplo, os valores da P_{50} para a HbA e HbF são de 26 e 20 mmHg, respectivamente. Na placenta, esta diferença possibilita que a HbF extraia oxigênio da HbA no sangue materno. Contudo, a HbF é subótima no período pós-parto, pois sua elevada afinidade pelo O_2 limita a quantidade de O_2 liberada para os tecidos.

A composição de subunidades dos tetrâmeros da hemoglobina sofre alterações complexas durante o desenvolvimento. A princípio, o feto humano sintetiza o tetrâmero $\xi_2\varepsilon_2$. Ao final do primeiro trimestre, as subunidades ξ e ε foram substituídas pelas subunidades α e γ, formando a HbF ($a_2\gamma_2$), a hemoglobina da vida fetal tardia. Embora a síntese de subunidades β comece no terceiro trimestre, as subunidades β não substituem por completo as subunidades γ para gerar a HbA adulta ($a_2\beta_2$) até algumas semanas após o parto (**Figura 6-7**).

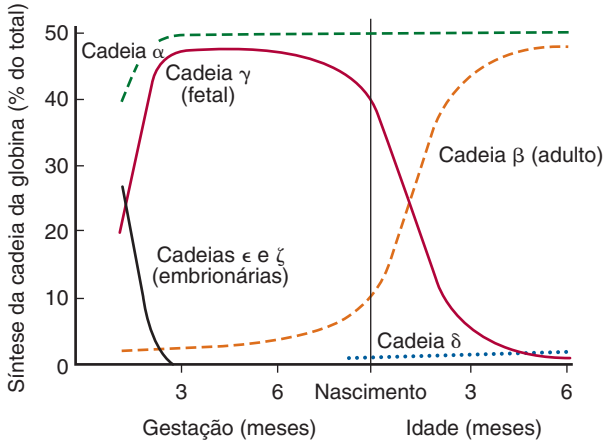


FIGURA 6-7 Padrão de desenvolvimento da estrutura quaternária das hemoglobinas fetal e neonatal. (Reproduzida, com autorização, de Ganong WF: *review of Medical Physiology,* 20th Ed. McGraw-Hill, 2001.)

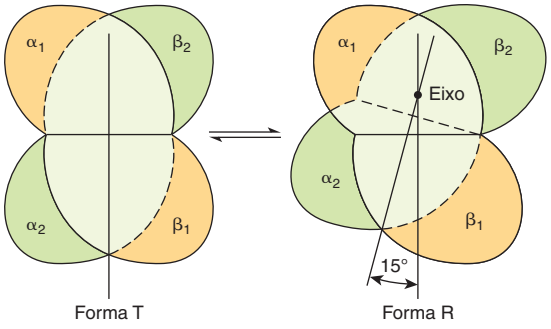


FIGURA 6-9 Durante a transição da forma T para a forma R da hemoglobina, o par das subunidades $\alpha_2\beta_2$ (verdes) rota 15° em relação ao par das subunidades $\alpha_1\beta_1$ (amarelas). O eixo da rotação é excêntrico, sendo que o par $\alpha_2\beta_2$ também se desvia um pouco no sentido do eixo. Na representação, o par $\alpha_1\beta_1$ amarelo é mostrado fixo, enquanto o par $\alpha_2\beta_2$ verde de subunidades se desloca e gira.

A oxigenação da hemoglobina é acompanhada por grandes alterações conformacionais

A ligação da primeira molécula de O_2 à desoxiHb desloca o ferro do heme no sentido do plano do anel do heme a partir de uma posição aproximadamente 0,04 nm além dele (**Figura 6-8**). Esse movimento é transmitido para a histidina proximal (F8) e para os resíduos ligados daí em diante, o que, por sua vez, provoca a ruptura das pontes salinas entre os resíduos da carboxila terminal de todas as quatro subunidades. Como resultado, um par das subunidades α/β rota 15° em relação ao outro, compactando o tetrâmero (**Figura 6-9**). As alterações profundas nas estruturas secundária, terciária e quaternária acompanham a transição da hemoglobina induzida pelo O_2 do **estado T** (***taut*** em inglês, tenso), de baixa afinidade, para o **estado R (relaxado),** de alta afinidade. Essas alterações aumentam muito a afinidade do restante dos hemes não oxigenados pelo O_2, pois os eventos de ligação subsequentes exigem a ruptura de menos pontes salinas (**Figura 6-10**). Os termos T e R também são utilizados para se referir às conformações de baixa afinidade e alta afinidade das enzimas alostéricas, respectivamente.

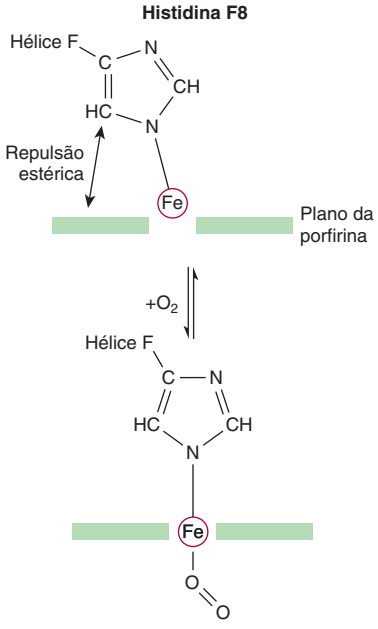


FIGURA 6-8 O átomo de ferro se move para o plano do heme na oxigenação. A histidina F8 e seus resíduos associados são puxados juntamente com o átomo de ferro. (Ligeiramente modificada e reproduzida, com autorização, de Stryer L: *Biochemistry*, 3rd ed. Freeman, 1988. Copyright © 1988 W. H. Freeman and Company.)

Após a liberação de O_2 nos tecidos, a hemoglobina transporta o CO_2 e os prótons até os pulmões

Além de transportar o O_2 dos pulmões até os tecidos periféricos, a hemoglobina transporta o CO_2, o subproduto da respiração, e os prótons dos tecidos periféricos até os pulmões. A hemoglobina carrega o CO_2 como carbamatos formados com os nitrogênios aminoterminais das cadeias polipeptídicas:

$$CO_2 + Hb{-}NH_3^+ \rightleftharpoons 2H^+ + Hb{-}\underset{\displaystyle H}{\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{N{-}C{-}O^-}}}$$

Os carbamatos mudam a carga nos aminoterminais de positiva para negativa, favorecendo a formação de pontes salinas entre as cadeias α e β.

Os carbamatos da hemoglobina contribuem com aproximadamente 15% do CO_2 no sangue venoso. Grande parte do CO_2 restante é transportada como bicarbonato, o qual é formado nos eritrócitos pela hidratação do CO_2 em ácido carbônico (H_2CO_3), um processo catalisado pela anidrase carbônica. No pH do sangue venoso, o H_2CO_3 se dissocia em bicarbonato e em um próton.

$$CO_2 + H_2O \xrightleftharpoons{\text{ANIDRASE CARBÔNICA}} \underset{\text{Ácido carbônico}}{H_2CO_3} \xrightleftharpoons{\textit{(Espontâneo)}} HCO_3^- + H^+$$

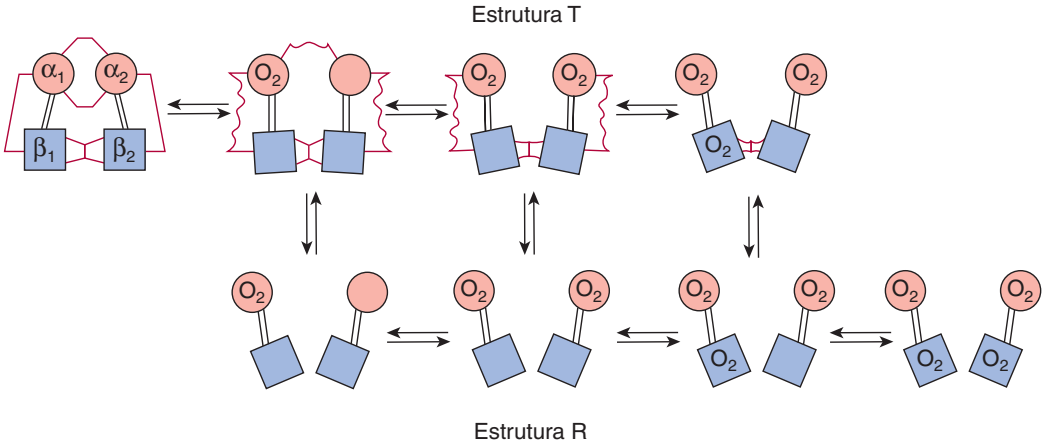


FIGURA 6-10 Transição da estrutura T para a estrutura R. Neste modelo, as pontes salinas (linhas vermelhas) que ligam as subunidades na estrutura T se quebram progressivamente à medida que o oxigênio é adicionado, sendo que mesmo aquelas pontes salinas que ainda não foram rompidas são progressivamente enfraquecidas (linhas vermelhas onduladas). A transição de T para R não ocorre depois que um número fixo de moléculas de oxigênio se ligou, mas se torna mais provável à medida que se liga o oxigênio sucessivo. A transição entre as duas estruturas é influenciada por prótons, dióxido de carbono, cloreto e BPG; quanto maiores forem suas concentrações, mais oxigênio deve ser ligado para deflagrar a transição. As moléculas totalmente oxigenadas na estrutura T e as moléculas totalmente desoxigenadas na estrutura R não são mostradas, pois são instáveis. (Modificada e redesenhada, com autorização, de Perutz MF: Hemoglobin structure and respiratory transport. Sci Am [Dec] 1978; 239:92.)

A desoxi-hemoglobina liga um próton para cada duas moléculas de O_2 liberadas, contribuindo significativamente para a capacidade de tamponamento do sangue. O pH menor dos tecidos periféricos, ajudado pela carbamatação, estabiliza o estado T e, assim, aumenta a liberação do O_2. Nos pulmões, o processo inverte. À medida que o O_2 se liga à desoxi-hemoglobina, os prótons são liberados e se combinam com o bicarbonato para formar acido carbônico. A desidratação do H_2CO_3, catalisada pela anidrase carbônica, forma CO_2, o qual é exalado. Desta maneira, a ligação do oxigênio direciona a expiração do CO_2 (**Figura 6-11**). Esse acoplamento inverso de próton e ligação de O_2 é denominado de **efeito Bohr**. O efeito Bohr é dependente das **interações cooperativas entre os hemes do tetrâmero da hemoglobina**. A mioglobina, um monômero, não exibe efeito Bohr.

Os prótons são liberados pela ruptura das pontes salinas quando o O_2 se liga

Os prótons responsáveis pelo efeito Bohr são liberados pela ruptura das pontes salinas durante a ligação do O_2 com a hemoglobina em estado T. A conversão para o estado R oxigenado quebra as pontes salinas que envolvem o resíduo His 146 da cadeia β. A subsequente dissociação dos prótons a partir da His 146 comanda a conversão do bicarbonato em acido carbônico (**Figura 6-11**). Após a liberação do O_2, a estrutura T e suas pontes salinas tornam a se formar. Essa alteração conformacional aumenta o pK_a dos resíduos His 146 da cadeia β, os quais ligam os prótons. Ao facilitar a reformação das pontes salinas, um aumento na concentração de próton estimula a liberação de O_2 a partir da hemoglobina oxigenada (estado R). Em contrapartida, um aumento na pO_2 promove a liberação de prótons.

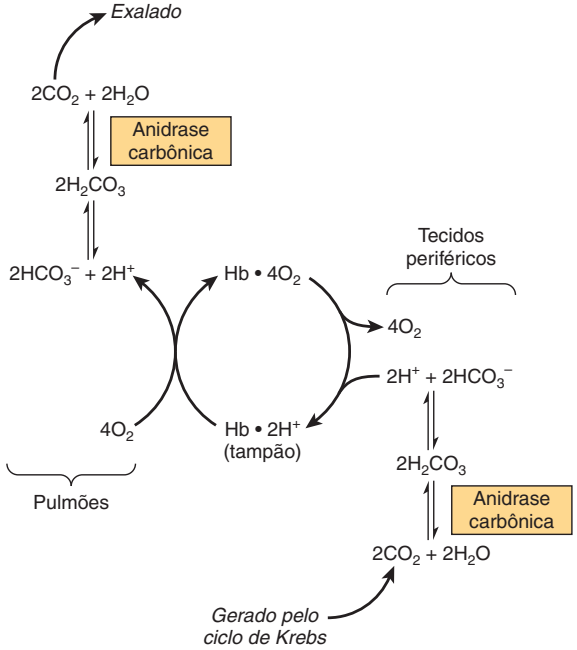
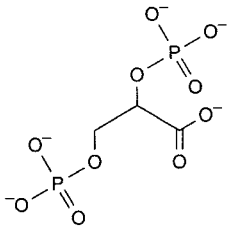


FIGURA 6-11 O efeito Bohr. O dióxido de carbono gerado nos tecidos periféricos combina-se com a água para formar o ácido carbônico, o qual se dissocia em prótons e íons bicarbonato. A desoxi-hemoglobina atua como um tampão ao se ligar a prótons, liberando-os para os pulmões. Nos pulmões, a captação de oxigênio pela hemoglobina libera prótons que se combinam com o íon bicarbonato, formando ácido carbônico, o qual, quando desidratado pela anidrase carbônica, se transforma em dióxido de carbono, que é então exalado.

O 2,3-BPG estabiliza a estrutura T da hemoglobina

Uma pO_2 baixa nos tecidos periféricos promove a síntese da 2,3-BPG nos eritrócitos a partir do intermediário glicolítico 1,3-BPG.



O tetrâmero da hemoglobina liga-se a uma molécula de BPG na cavidade central formada por suas quatro subunidades (Figura 6-6). No entanto, o espaço entre as hélices H das cadeias β que revestem a cavidade é suficientemente amplo para acomodar a BPG apenas quando a hemoglobina está no estado T. A BPG forma pontes salinas com os grupamentos aminoterminais das cadeias β, por meio de Val NA1 e com Lys EF6 e His H21 (**Figura 6-12**). Por conseguinte, a BPG estabiliza a hemoglobina desoxigenada (estado T) ao formar pontes salinas adicionais que devem ser rompidas antes da conversão para o estado R.

O resíduo H21 da subunidade γ da HbF é Ser em lugar de His. Como Ser não pode formar uma ponte salina, o BPG liga-se mais fracamente com a HbF que com a HbA. A menor estabilização conferida ao estado T pelo BPG contribui para que a HbF tenha uma maior afinidade pelo O_2 que a HbA.

A adaptação à altitude elevada

As alterações fisiológicas que acompanham a exposição prolongada à altitude elevada incluem um aumento no número de eritrócitos e em suas concentrações de hemoglobina e de BPG. A BPG elevada diminui a afinidade da HbA pelo O_2 (aumenta a P_{50}), o que estimula a liberação de O_2 nos tecidos periféricos.

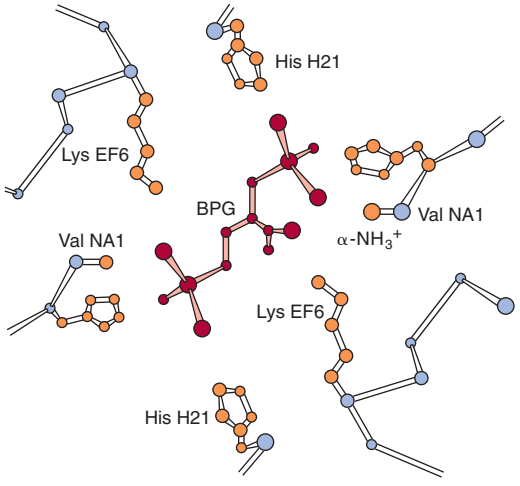


FIGURA 6-12 Modalidade de ligação do 2,3-bifosfoglicerato (BPG) à desoxi-hemoglobina humana. O BPG interage com três grupamentos positivamente carregados em cada cadeia β. (Com base em Arnone A: X-ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhemoglobin. Nature 1972;237:146. Copyright © 1972. Adaptado com autorização de Macmillan Publishers Ltd.)

FORAM IDENTIFICADAS INÚMERAS MUTAÇÕES QUE AFETAM AS HEMOGLOBINAS HUMANAS

As mutações nos genes que codificam as subunidades α ou β da hemoglobina podem afetar potencialmente sua função biológica. No entanto, quase a totalidade das mais de 1.100 mutações genéticas conhecidas que afetam as hemoglobinas humanas são extremamente raras e benignas, não representando anormalidades clínicas. Quando uma mutação realmente compromete a função biológica, a condição é denominada uma **hemoglobinopatia**. Estima-se que mais de 7% da população global seja formada por portadores de distúrbios da hemoglobina. Na página http://globin.cse.psu.edu/ (Globin Gene Server) fornece informações sobre – e *links* para – hemoglobinas normais e mutantes. Os exemplos selecionados são descritos adiante.

Metemoglobina e hemoglobina M

Na metemoglobinemia, o ferro do heme é férrico em lugar de ferroso. Desta maneira, a metemoglobina não pode se ligar nem transportar o O_2. Normalmente, a enzima metemoglobina redutase reduz o Fe^{3+} da metemoglobina para o Fe^{2+}. A metemoglobina pode surgir por meio da oxidação do Fe^{2+} para Fe^{3+} como um efeito colateral de agentes tais como as sulfonamidas, a partir da hemoglobina M hereditária, ou consequente à atividade reduzida da enzima metemoglobina redutase.

Na hemoglobina M, a histidina F8 (His F8) foi substituída pela tirosina. O ferro da HbM forma um firme complexo iônico com o ânion fenolato da tirosina que estabiliza a forma Fe^{3+}. Na cadeia α das variantes da hemoglobina M, o equilíbrio R-T favorece o estado T. A afinidade pelo oxigênio é reduzida e o efeito Bohr é ausente. A cadeia β das variantes da hemoglobina M exibe torção R-T, sendo que, por isso, o efeito Bohr está presente.

As mutações que favorecem o estado R (p. ex., hemoglobina Chesapeake) aumentam a afinidade pelo O_2. Essas hemoglobinas falham, portanto, em liberar o O_2 adequado para os tecidos periféricos. A hipóxia tecidual resultante leva à **policitemia**, uma concentração aumentada de eritrócitos.

Hemoglobina S

Na HbS, o aminoácido não polar valina substituiu o resíduo de superfície polar Glu6 da subunidade β, gerando uma "**placa viscosa**" hidrofóbica na superfície da subunidade β tanto da oxiHbS quanto da desoxiHbS. A HbA e a HbS contêm uma placa viscosa complementar em suas superfícies que é exposta apenas no estado T desoxigenado. Desta forma, no PO_2 baixo, a desoxiHbS pode polimerizar-se para formar fibras longas e insolúveis. A ligação da desoxi-HbA termina a polimerização de fibras, pois a HbA carece da segunda placa viscosa necessária para ligar outra molécula de Hb (**Figura 6-13**). Essas fibras helicoidais torcidas distorcem o eritrócito em uma característica forma de foice,

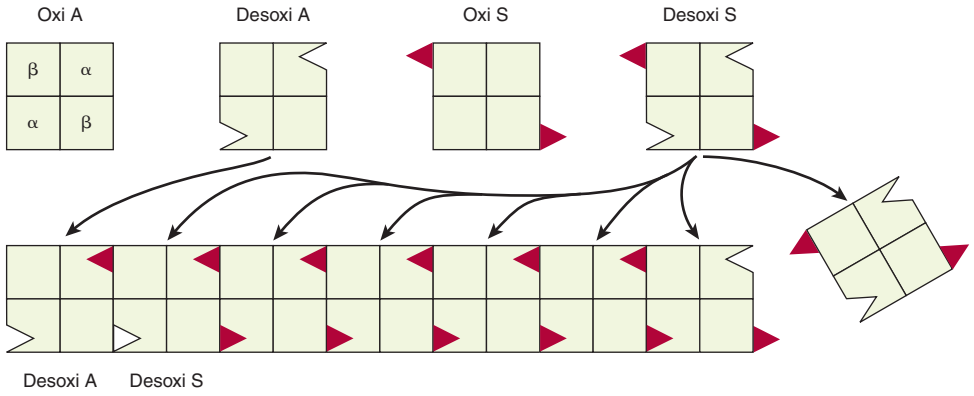


FIGURA 6-13 Representação da placa viscosa (▲) na hemoglobina S e seu receptor (Δ) na desoxi-hemoglobina A e desoxi-hemoglobina S. As superfícies complementares permitem que a desoxi-hemoglobina S se polimerize em uma estrutura fibrosa, mas a presença da desoxi-hemoglobina A terminará a polimerização ao fracassar em fornecer as placas viscosas. (Modificada e reproduzida, com autorização, de Stryer L: *Biochemistry*, 3rd Ed. Freeman, 1988. Copyright © 1988 W. H. Freeman and Company.)

tornando-a vulnerável à lise nos interstícios dos sinusoides esplênicos. Elas também provocam múltiplos efeitos clínicos secundários. Uma pO_2 baixa, como aquela em altitudes elevadas, exacerba a tendência de polimerização. Os tratamentos emergentes para a doença falciforme incluem a indução da expressão da HbF para inibir a polimerização da HbS, o transplante de células-tronco e, no futuro, a terapia gênica.

IMPLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Mioglobinúria

Após a lesão maciça por esmagamento, a mioglobina liberada a partir das fibras musculares lesionadas colore a urina em vermelho escuro. A mioglobina pode ser detectada no plasma após um infarto do miocárdio, mas o ensaio das enzimas séricas (ver Capítulo 7) fornece um índice mais sensível da lesão miocárdica.

Anemias

As anemias, reduções no número de eritrócitos ou de hemoglobina no sangue, podem refletir a síntese comprometida da hemoglobina (p. ex., na deficiência de ferro; Capítulo 50) ou a produção comprometida de eritrócitos (p. ex., na deficiência de ácido fólico ou de vitamina B_{12}; Capítulo 44). O diagnóstico das anemias começa com a medição espectroscópica dos níveis de hemoglobina no sangue.

Talassemias

Os defeitos genéticos conhecidos como talassemias resultam da ausência parcial ou total de uma ou mais cadeias α ou β da hemoglobina. Mais de 750 mutações diferentes foram identificadas, porém apenas três são comuns. Tanto a cadeia α (α-talassemias), quanto a cadeia β (β-talassemias) podem ser afetadas. Um sobrescrito indica se uma subunidade está totalmente ausente (α^0 ou β^0) ou se a sua síntese está reduzida (α^- ou β^-). Excetuando-se o transplante de medula, o tratamento é sintomático.

Determinadas hemoglobinas mutantes são comuns em muitas populações, sendo que um paciente pode herdar mais de um tipo. Dessa maneira, os distúrbios da hemoglobina apresentam um complexo padrão de fenótipos clínicos. O emprego de sondas de DNA para seu diagnóstico é abordado no Capítulo 39.

Hemoglobina glicada (HbA_{1C})

Quando a glicose sanguínea penetra nos eritrócitos, ela glica o grupamento ε-amino dos resíduos lisil e os aminoterminais da hemoglobina. A fração da hemoglobina glicada, normalmente em torno de 5%, é proporcional à concentração de glicose no sangue. Como a meia-vida de um eritrócito geralmente é de 60 dias, o nível da hemoglobina glicada (HbA_{1C}) reflete a concentração média de glicose no sangue durante as seis a oito semanas anteriores. A medição da HbA_{1C} fornece, portanto, valiosas informações para o tratamento do diabetes melito.

RESUMO

- A mioglobina é monomérica; a hemoglobina é um tetrâmero de dois tipos de subunidades ($\alpha_2\beta_2$ na HbA). Embora possuam estruturas primárias distintas, a mioglobina e as subunidades da hemoglobina apresentam estruturas secundárias e terciárias quase idênticas.
- O grupamento heme, um tetrapirrol cíclico, essencialmente planar e ligeiramente enrugado, possui um Fe^{2+} central ligado a todos os quatro átomos de nitrogênio do heme, à histidina F8 e, na oxiMb e oxiHb, também ao O_2.
- A curva de ligação de O_2 para a mioglobina é hiperbólica, mas, para a hemoglobina, ela é sigmoidal, uma consequência das interações cooperativas no tetrâmero. A cooperatividade maximiza a capacidade da hemoglobina tanto para transportar O_2 na pO_2 dos pulmões quanto para liberar O_2 na pO_2 dos tecidos.
- As afinidades relativas das diferentes hemoglobinas pelo oxigênio são expressas como P_{50}, a pO_2 que as satura pela metade com O_2. As hemoglobinas saturam em pressões parciais de seu respectivo órgão respiratório, por exemplo, o pulmão ou a placenta.

- Na oxigenação da hemoglobina, o ferro, a histidina F8 e os resíduos ligados se movimentam no sentido do anel do heme. As alterações conformacionais que acompanham a oxigenação incluem a ruptura das ligações salinas e o afrouxamento da estrutura quaternária, facilitando a ligação de O_2 adicional.
- O 2,3-BPG na cavidade central da desoxiHb forma ligações salinas com as subunidades β que estabilizam a desoxiHb. Na oxigenação, a cavidade central se contrai, o BPG sofre extrusão e a estrutura quaternária afrouxa.
- A hemoglobina também atua no transporte de CO_2 e de próton desde os tecidos até os pulmões. A liberação do O_2 a partir da oxiHb nos tecidos é acompanhada pela captação dos prótons devido à diminuição do pK_a dos resíduos de histidina.
- Na hemoglobina falciforme (HbS), a Val substitui o Glu β6 da HbA, criando uma "placa viscosa" que possui um complemento na desoxiHb (mas não na oxiHb). A desoxiHbS polimeriza-se em baixas concentrações de O_2, formando fibras que torcem os eritrócitos em formatos de foice.
- As α e β-talassemias são anemias que resultam da produção reduzida das subunidades α e β da HbA, respectivamente.

REFERÊNCIAS

Frauenfelder H, McMahon BH, Fenimore PW: Myoglobin: The hydrogen atom of biology and a paradigm of complexity. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:8615.

Hardison RC, Chui DH, Riemer C, et al: Databases of human hemoglobin variants and other resources at the globin gene server. Hemoglobin 2001;25:183.

Lukin JA, Ho C: The structure–function relationship of hemoglobin in solution at atomic resolution. Chem Rev 2004;104:1219.

Ordway GA, Garry DJ: Myoglobin: An essential hemoprotein in striated muscle. J Exp Biol 2004;207:3441.

Papanikolaou E, Anagnou NP: Major challenges for gene therapy of thalassemia and sickle cell dsease. Curr Gene Ther 2010;10:404.

Schrier SL, Angelucci E: New strategies in the treatment of the thalassemias. Annu Rev Med 2005;56:157.

Steinberg MH, Brugnara C: Pathophysiological-based approaches to treatment of sickle-cell disease. Annu Rev Med 2003;54:89.

Umbreit J: Methemoglobin—it's not just blue: A concise review. Am J Hematol 207;82:134.

Weatherall DJ, Akinyanju O, Fucharoen S, et al: Inherited disorders of hemoglobin. In: *Disease Control Priorities in Developing Countries,* Jamison DT, Breman JG, Measham AR (editors). Oxford University Press and the World Bank, 2006;663–680.

Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR, et al: The hemoglobinopathies. In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease,* 8th ed. Scriver CR, Sly WS, Childs B, et al (editors). McGraw-Hill, 2000;4571.

Weatherall DJ, Clegg JD: *The Thalassemia Syndromes.* Blackwell Science, 2001.

Yonetani T, Laberge M: Protein dynamics explain the allosteric behaviors of hemoglobin. Biochim Biophys Acta 2008;1784:1146.

CAPÍTULO

7

Enzimas: Mecanismo de Ação

Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Ilustrar as relações estruturais entre as vitaminas B e as coenzimas.
- Delinear os quatro principais mecanismos pelos quais as enzimas realizam a catálise.
- Descrever como um "ajuste induzido" facilita o reconhecimento do substrato e sua catálise.
- Delimitar os princípios subjacentes dos imunoensaios ligados a enzimas.
- Explicar como o acoplamento de uma enzima a uma desidrogenase $NAD(P)^+$-dependente pode simplificar o ensaio de sua atividade.
- Identificar as enzimas e proteínas cujos níveis plasmáticos são utilizados para o diagnóstico e prognóstico de um infarto do miocárdio.
- Referir a aplicação das endonucleases de restrição e dos polimorfismos de comprimento do fragmento de restrição na detecção das doenças genéticas.
- Explicar a utilidade da mutagênese sítio dirigida para a identificação dos resíduos envolvidos na catálise, no reconhecimento dos substratos ou efetores alostéricos, ou no mecanismo de ação da enzima.
- Relatar como a adição de "etiquetas" de afinidade fundidas por meio da tecnologia do DNA recombinante pode facilitar a purificação de uma proteína expressa a partir de seu gene clonado.
- Indicar a função das proteases específicas na purificação das enzimas etiquetadas por afinidade.
- Discutir os eventos que levam à descoberta de que os RNAs podem atuar como enzimas.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

As enzimas são polímeros biológicos que catalisam as reações químicas que possibilitam a vida. A presença e a manutenção de um conjunto completo e balanceado das enzimas são essenciais para a clivagem dos nutrientes para fornecer energia e blocos de construção química; para a composição desses blocos de construção em proteínas, DNA, membranas, células e tecidos; e para a conservação da energia para impulsionar a motilidade da célula, função neural e contração muscular. A grande maioria das enzimas é formada por proteínas. As notáveis exceções incluem os **RNAs ribossomais** e um grupo de moléculas de RNA com autoclivagem ou *auto-splicing* coletivamente conhecidas como **ribozimas**. A capacidade de provar a atividade de enzimas específicas no sangue, em outros líquidos orgânicos ou em extratos celulares ajuda no diagnóstico e no prognóstico da doença. As deficiências na quantidade ou atividade catalítica de enzimas importantes podem resultar de defeitos genéticos, déficits nutricionais ou de toxinas. As enzimas defeituosas podem resultar de mutações genéticas ou da infecção por patógenos virais ou bacterianos (p. ex., *Vibrio cholerae*). Os cientistas médicos abordam as alterações na atividade enzimática ao usar agentes farmacológicos para inibir enzimas específicas e estão investigando a terapia gênica como um meio para remediar os déficits no nível ou na função da enzima.

Além de servir como os catalisadores para todos os processos metabólicos, suas impressionantes atividade catalítica, especificidade do substrato e estereoespecificidade capacitam as enzimas a preencher os papéis principais em outros processos relacionados com a saúde e o bem-estar do ser humano. A estereoespecificidade absoluta das enzimas é de valor primordial no uso de catalisadores solúveis ou imobilizados para reações específicas na síntese de um medicamento ou antibiótico. As proteases e as amilases aumentam a capacidade dos detergentes de remover sujeira e manchas. As enzimas desempenham um papel importante na produção ou na

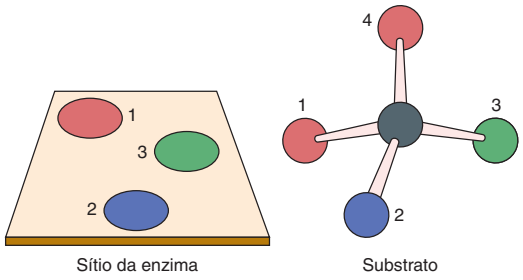


FIGURA 7-1 Representação planar da "inserção de três pontos" de um substrato no sítio ativo de uma enzima. Embora os átomos 1 e 4 sejam idênticos, quando os átomos 2 e 3 se ligam aos sítios complementares na enzima, apenas o átomo 1 pode se ligar. Uma vez ligados a uma enzima, os átomos aparentemente idênticos podem ser então diferenciáveis, permitindo uma alteração química estereoespecífica.

acentuação do valor nutricional de produtos alimentares para seres humanos e animais. Por exemplo, a protease renina é utilizada na produção de queijos, enquanto a lactase é empregada para remover a lactose do leite para o benefício de pessoas intolerantes à lactose que apresentam deficiência desta enzima hidrolítica (Capítulo 43).

AS ENZIMAS SÃO CATALISADORES EFETIVOS E ALTAMENTE ESPECÍFICOS

As enzimas que catalisam a conversão de um ou mais compostos (**substratos**) em um ou mais compostos diferentes (**produtos**) aumentam as velocidades da reação não catalisada correspondente em fatores mínimos de 10^6. Como todos os catalisadores, as enzimas não são consumidas nem alteradas de maneira permanente como consequência de sua participação em uma reação.

Além de serem altamente eficientes, as enzimas também são catalisadores extremamente seletivos. Ao contrário da maioria dos catalisadores utilizados na química sintética, as enzimas são específicas tanto para o tipo de reação catalisada quanto para um único substrato ou um pequeno grupo de substratos intimamente relacionados. As enzimas também são catalisadores estereoespecíficos e catalisam, geralmente, as reações de apenas um estereoisômero de um determinado composto – por exemplo, os D-açúcares, mas não os L-açúcares; e os L-aminoácidos, mas não os D-aminoácidos. Como elas se ligam aos substratos por meio de pelo menos "três pontos de ligação", as enzimas podem até mesmo converter os substratos não quirais em produtos quirais. A **Figura 7-1** ilustra por que a redução do substrato não quiral piruvato catalisada por enzima produz apenas L-lactato e não uma mistura racêmica do D- e L-lactato. A excelente especificidade dos catalisadores enzimáticos imbui às células vivas a capacidade de conduzir simultaneamente e controlar de maneira independente um amplo espectro de processos químicos.

AS ENZIMAS SÃO CLASSIFICADAS PELO TIPO DE REAÇÃO

Os nomes comumente empregados para a maioria das enzimas descrevem o tipo da reação catalisada, seguido pelo sufixo *–ase*. Por exemplo, as desidrogenases removem átomos de hidrogênio, as proteases hidrolisam as proteínas e as isomerases catalisam os rearranjos na configuração. Os modificadores podem anteceder ou suceder o nome para indicar o substrato (*xantina* oxidase), a origem da enzima (ribonuclease *pancreática*, sua regulação (lipase *hormônio-sensível*) ou uma característica de seu mecanismo de ação (cisteína protease). Onde necessário, os designadores alfanuméricos são acrescentados para identificar as múltiplas formas de uma enzima (p. ex., RNA-polimerase *III*; proteinoquinase Cβ).

Para abordar as ambiguidades, a International Union of Biochemists (IUB) desenvolveu um sistema inequívoco da nomenclatura das enzimas, no qual cada enzima possui um nome próprio e um número de código que identificam o tipo da reação catalisada e os substratos envolvidos. As enzimas são agrupadas nas seis classes a seguir.

1. **Oxidorredutases –** enzimas que catalisam as oxidações e reduções.
2. **Transferases –** enzimas que catalisam a transferência de moléculas como os grupamentos glicosil, metil ou fosforil.
3. **Hidrolases –** enzimas que catalisam a clivagem *hidrolítica* de ligações C—C, C—O, C—N e outras ligações covalentes.
4. **Liases** – enzimas que catalisam a clivagem de ligações C—C, C—O, C—N e outras ligações covalentes por meio da *eliminação de átomo*, gerando duplas ligações.
5. **Isomerases –** enzimas que catalisam alterações geométricas ou estruturais *dentro* de uma molécula.
6. **Ligases** – enzimas que catalisam a união (ligação) de duas moléculas nas reações acopladas à hidrólise da ATP.

Apesar da clareza do sistema IUB, os nomes são extensos e relativamente problemáticos, de modo que, em geral, a referência às enzimas continua sendo por seus nomes tradicionais, embora por vezes ambíguos. O nome IUB para a hexoquinase ilustra tanto a clareza do sistema IUB quanto suas complexidades. O nome da IUB da hexoquinase é ATP:D-hexose-6-fosfotransferase E.C.2.7.1.1. Esse nome identifica a hexoquinase como um membro da classe 2 (transferases), subclasse 7 (transferência de um grupamento fosforil), sub-subclasse 1 (o álcool é o aceptor do fosforil) e "hexose-6" indica que o álcool fosforilado está no carbono seis de uma hexose. No entanto, continua sendo chamada de hexoquinase.

GRUPAMENTOS PROSTÉTICOS, COFATORES E COENZIMAS DESEMPENHAM PAPÉIS IMPORTANTES NA CATÁLISE

Muitas enzimas contêm pequenas moléculas não proteicas e íons metálicos que participam diretamente na ligação com o substrato ou na catálise. Denominados **grupamentos prostéticos**, **cofatores** e **coenzimas**, eles aumentam o repertório de capacidades catalíticas além daquelas conferidas pelo número limitado de grupamentos funcionais presentes nas cadeias laterais aminoacil dos peptídeos.

Os grupamentos prostéticos estão firmemente integrados na estrutura de uma enzima

Os grupamentos prostéticos estão incorporados de maneira firme e estável na estrutura de uma proteína por meio de forças covalentes ou não covalentes. Os exemplos incluem o piridoxal fosfato, a flavina mononucleotídeo (FMN), a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), a tiamina pirofosfato, a biotina e os íons metálicos do Co, Cu, Mg, Mn e Zn. Os metais constituem os grupamentos prostéticos mais comuns. Quase um terço de todas as enzimas que contêm íons metálicos firmemente ligados é denominado de **metaloenzimas**. Os íons metálicos que participam nas reações redox geralmente formam complexos com os grupamentos prostéticos como o heme (Capítulo 6) ou centros ferro-enxofre (Capítulo 12). Os metais também podem facilitar a ligação e a orientação dos substratos, a formação de ligações covalentes com intermediários da reação (Co^{2+} na coenzima B_{12}), ou por atuar como bases ou ácidos de Lewis para tornar os substratos mais **eletrofílicos** (pobres em elétrons) ou **nucleofílicos** (ricos em elétrons), e, por isso, mais reativos.

Os cofatores se associam de maneira reversível com as enzimas ou substratos

Os **cofatores** servem a funções similares àquelas dos grupamentos prostéticos, mas se ligam, de maneira transitória e dissociável, quer à enzima, quer a um substrato, como o ATP. Diferente dos grupamentos prostéticos associados de forma estável, os cofatores devem estar presentes no meio adjacente à enzima para que ocorra a catálise. Os cofatores mais comuns também são os íons metálicos. As enzimas que requerem um íon metálico como cofator são denominadas **enzimas ativadas por metal** para diferenciá-las das **metaloenzimas**, para as quais os íons metálicos servem como grupamentos prostéticos.

As coenzimas servem como transportadores de substrato

As **coenzimas** servem como transportadores recicláveis – ou agentes de transferência de grupamentos – que transportam muitos substratos de um ponto para outro dentro da célula. A função destes transportadores é dupla. Em primeiro lugar, eles estabilizam espécies como os átomos de hidrogênio (FADH) ou os íons hidreto (NADH) que também são reativos para persistir durante qualquer intervalo de tempo significativo na presença da água ou de moléculas orgânicas que permeiam o interior da célula. Elas também servem como um adaptador ou cabo que facilita o reconhecimento e a ligação de pequenos grupamentos químicos por suas enzimas-alvo, como o acetato (coenzima A). Outras moléculas químicas transportadas pelas coenzimas incluem os grupamentos metil (folatos) e os oligossacarídeos (dolicol).

Muitas coenzimas, cofatores e grupamentos prostéticos são derivados das vitaminas B

As vitaminas B hidrossolúveis fornecem importantes componentes de inúmeras coenzimas. Varias coenzimas contêm, além disto, as moléculas de adenina, ribose e grupamentos fosforil do AMP ou ADP (**Figura 7-2**). A **nicotinamida** é um componente de coenzimas redox NAD e NADP, enquanto a **riboflavina** é um componente de coenzimas redox FMN e FAD. O **ácido pantotênico** é um grupamento do transportador de grupamento acil **coenzima A**. Como seu pirofosfato, a **tiamina** participa na descarboxilação de α-cetoácidos, sendo que as coenzimas **ácido fólico** e **cobamida** atuam no metabolismo do carbono.

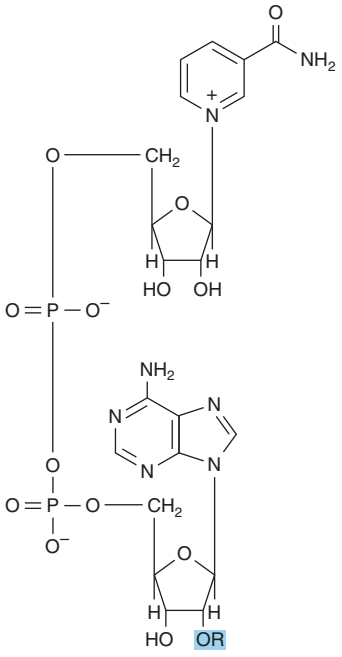


FIGURA 7-2 Estrutura do NAD^+ e $NADP^+$. Para o NAD^+, R = H. Para o $NADP^+$, R = PO_3^{2-}.

A CATÁLISE OCORRE NO SÍTIO ATIVO

Uma importante visão do início do século XX sobre a catálise enzimática veio da observação de que a presença de substratos torna as enzimas mais resistentes aos efeitos desnaturantes das temperaturas elevadas. Essa observação levou Emil Fischer a propor que as enzimas e seus substratos interagem para formar um complexo enzima-substrato (ES), cuja estabilidade térmica era maior que aquela da própria enzima. Essa opinião modelou intensamente nossa compreensão da natureza química e do comportamento cinético (Capítulo 8) da catálise enzimática.

Fischer argumentou que a especificidade extremamente alta com que essas enzimas separam seus substratos quando formam um complexo ES era análoga à maneira pela qual uma fechadura mecânica distingue a chave apropriada. Na maioria das enzimas, a "fechadura" é formada por uma fenda ou depressão na superfície da proteína que forma parte de uma região denominada de **sítio ativo** (Figuras 5-6 e 5-8). Conforme implícito pelo adjetivo "ativo", o sítio ativo é mais do que um simples sítio de reconhecimento para substratos de ligação. No interior do sítio ativo, os substratos são trazidos para ficar próximos entre si em um alinhamento ótimo com os cofatores, grupamentos prostéticos e cadeias laterais de aminoácidos responsáveis por catalisar suas transformações químicas em produtos (**Figura 7-3**). A catálise é adicionalmente estimulada pela capacidade do sítio ativo para

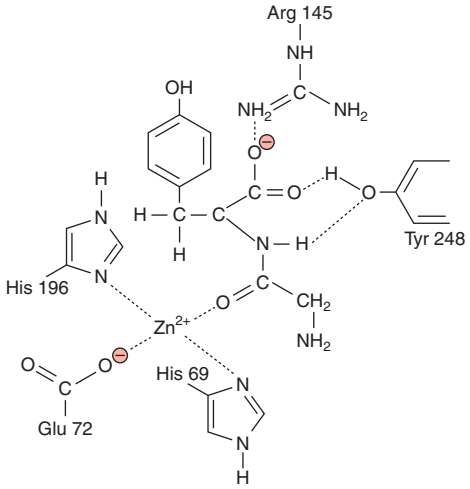


FIGURA 7-3 Representação bidimensional de um substrato dipeptídico, glicil-tirosina, ligado dentro do sítio ativo da carboxipeptidase A.

proteger os substratos contra a água e produzir um ambiente cuja polaridade, hidrofobicidade, acidez ou alcalinidade podem diferir acentuadamente daquelas do citoplasma adjacente.

AS ENZIMAS EMPREGAM MÚLTIPLOS MECANISMOS PARA FACILITAR A CATÁLISE

As enzimas utilizam diversas combinações dos quatro mecanismos gerais para obter a acentuada estimulação catalítica das velocidades das reações químicas.

Catálise por proximidade

Para as moléculas reagirem, elas devem estar dentro da distância de formação de ligação entre si. Quanto maior suas concentrações, com maior frequência elas irão defrontar-se e maior será a velocidade de suas reações. Quando uma enzima se liga a moléculas do substrato em seu sítio ativo, ela cria uma região de alta concentração local de substrato. Esse ambiente também orienta espacialmente as moléculas do substrato para uma posição ideal para que elas façam a interação, resultando em acréscimos adicionais da velocidade em pelo menos mil vezes.

Catálise acidobásica

Os grupamentos funcionais ionizáveis das cadeias laterais aminoacil e (quando presentes) dos grupamentos prostéticos contribuem para a catálise ao agir como ácidos ou bases. A catálise acidobásica pode ser específica ou geral. Por específica compreende-se apenas os prótons (H_3O^+) ou os íons OH^-. Na **catálise ácida específica** ou na **catálise básica específica**, a velocidade da reação é sensível às mudanças na concentração dos prótons, mas *independe* das concentrações de outros ácidos (doadores de prótons) ou bases (aceptores de prótons) presentes na solução ou no sítio ativo. Diz-se que as reações cujas velocidades são responsivas a *todos* os ácidos ou bases presentes estão sujeitas à **catálise ácida geral** ou à **catálise básica geral**.

Catálise por tensão

As enzimas que catalisam reações *líticas,* que envolvem a ruptura de uma ligação covalente, comumente se ligam a seus substratos em uma conformação que é um tanto desfavorável para a ligação que irá sofrer clivagem. Essa conformação imita aquela do **estado intermediário de transição**, uma espécie transitória que representa o estado de transição, ou o ponto médio, na transformação de substratos em produtos. A tensão resultante estira ou distorce a ligação-alvo, enfraquecendo-a e tornando-a mais vulnerável à clivagem. O detentor do Prêmio Nobel Linus Pauling foi o primeiro a sugerir um papel para a estabilização do estado de transição como um mecanismo geral pelo qual as enzimas aceleram as velocidades das reações químicas. O conhecimento do estado de transição de uma reação catalisada por enzima é frequentemente explorado pelos químicos para idealizar e criar inibidores mais efetivos das enzimas, chamados **análogos do estado de transição**, como farmacóforos potenciais.

Catálise covalente

O processo da **catálise covalente** envolve a formação de uma ligação covalente entre a enzima e um ou mais substratos. Em seguida, a enzima modificada se transforma em um reagente. A catálise covalente introduz uma nova reação cuja energia de ativação é menor – e, portanto, a reação é mais rápida – que a trajetória da reação em solução homogênea. No entanto, a modificação química da enzima é transitória. O término da reação devolve a enzima a seu estado não modificado original. Dessa maneira, sua função permanece a de catalisador. A catálise covalente é particularmente comum entre as enzimas que catalisam as reações de transferência de grupamento. Os resíduos na enzima que participam na catálise covalente geralmente são a cisteína ou a serina e, ocasionalmente, a histidina. Com frequência, a catálise covalente segue um mecanismo de "pingue-pongue" – aquele em que o primeiro substrato é ligado e seu produto é liberado antes da ligação do segundo substrato (**Figura 7-4**).

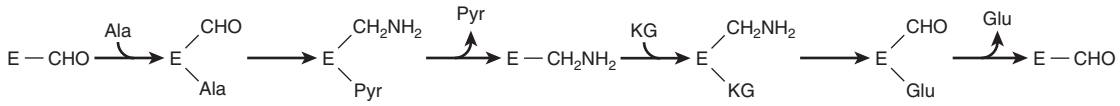


FIGURA 7-4 Mecanismo de "pingue-pongue" para a transaminação. E—CHO e E—CH_2NH_2 representam os complexos enzima-piridoxal fosfato e enzima-piridoxamina, respectivamente. (Ala, alanina; Glu, glutamato; KG, α-cetoglutarato; Pyr, Piruvato.)

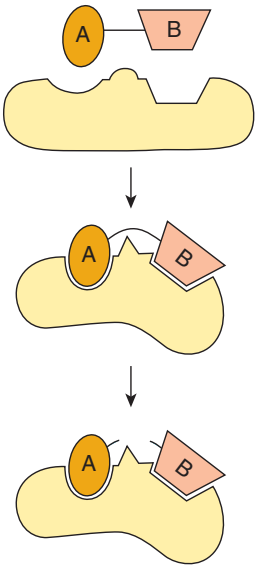


FIGURA 7-5 Representação bidimensional do modelo de adaptação induzida de Koshland do sítio ativo de uma liase. A ligação do substrato A—B induz alterações conformacionais na enzima que alinham os resíduos catalíticos que participam na catálise e tensionam a ligação entre A e B, facilitando sua clivagem.

OS SUBSTRATOS INDUZEM ALTERAÇÕES CONFORMACIONAIS NAS ENZIMAS

Embora o "modelo de chave e fechadura" de Fischer tenha contribuído para a excelente especificidade das interações enzima-substrato, a rigidez imposta ao sítio ativo da enzima falhou em contribuir para as alterações dinâmicas que, atualmente, se sabe que acompanham a catálise. Esse obstáculo foi abordado pelo modelo de **ajuste induzido** de Daniel Koshland, o qual diz que, quando os substratos se aproximam e se ligam a uma enzima, eles induzem uma alteração conformacional análoga a colocar uma mão (substrato) em uma luva (enzima) (**Figura 7-5**). Por sua vez, a enzima induz alterações recíprocas em seus substratos, mantendo a energia de ligação para facilitar a transformação dos substratos em produtos. O modelo do ajuste induzido foi amplamente confirmado por estudos biofísicos da movimentação da enzima durante a ligação com o substrato.

A PROTEASE DO HIV ILUSTRA A CATÁLISE ACIDOBÁSICA

As enzimas da **família da aspartato protease**, que inclui a enzima digestiva pepsina, as catepsinas lisossomais e a protease produzida pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), compartilham um mecanismo catalítico comum. A catálise envolve dois resíduos de aspartil conservados, os quais agem como catalisadores acidobásicos. No primeiro estágio da reação, um aspartato agindo como uma base geral (Asp X, **Figura 7-6**), extrai um próton de uma molécula de água, tornando-a mais nucleofílica. O nucleófilo resultante ataca, em seguida, o carbono da carbonila eletrofílico da ligação peptídica visada para a hidrólise, formando **um estado de transição intermediário tetraédrico**. Um segundo aspartato (Asp Y, Figura 7-6) facilita, então, a decomposição desse intermediário tetraédrico ao doar um próton para o grupamento amino por meio da ruptura da ligação peptídica. Os aspartatos de dois sítios ativos diferentes podem atuar simultaneamente como uma base geral ou como um ácido geral, pois seu ambiente adjacente favorece a ionização de um, mas não do outro.

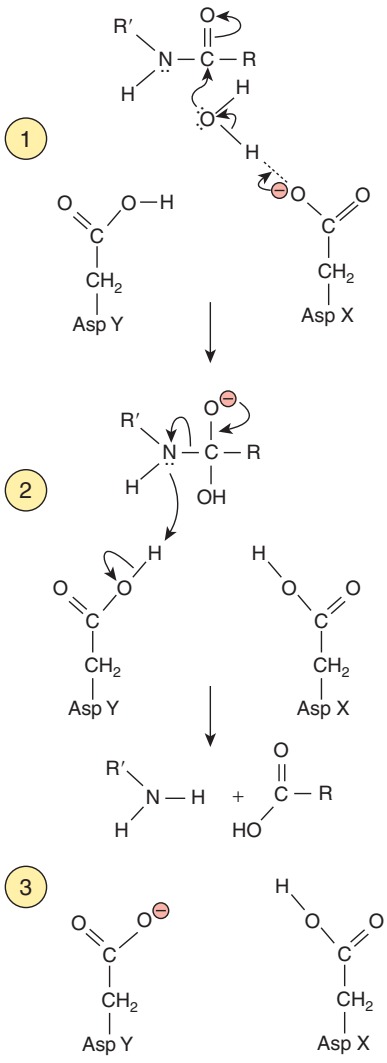


FIGURA 7-6 Mecanismo para a catálise por uma protease aspártica como a protease do HIV. As setas curvas indicam as direções do movimento do elétron. ① O aspartato X age como uma base para ativar uma molécula de água ao abstrair um próton. ② A molécula de água ativada ataca a ligação peptídica, formando um intermediário tetraédrico transitório. ③ O aspartato Y age como um ácido para facilitar a clivagem do intermediário tetraédrico e para a liberação dos produtos de degradação ao doar um próton para o grupamento amino recentemente formado. O transporte subsequente do próton no Asp X para o Asp Y restaura a protease para seu estado inicial.

A QUIMOTRIPSINA E A FRUTOSE-2,6-BIFOSFATASE ILUSTRAM A CATÁLISE COVALENTE

Quimotripsina

Enquanto a catálise pelas aspartato proteases envolve o ataque hidrolítico direto da água em uma ligação peptídica, a catálise pela **serina protease** quimotripsina envolve a formação prévia de um intermediário acil-enzima covalente. Um resíduo seril altamente reativo, serina 195, participa em uma rede de retransmissão de carga com a histidina 57 e o aspartato 102. Embora esses três resíduos estejam muito distantes na estrutura primária, no sítio ativo da proteína madura dobrada, eles estão dentro da distância de formação de ligação entre si. Alinhados na ordem Asp 102-His 57-Ser 195, eles constituem uma "**rede de retransmissão de carga**" que atua como um "**transportador de próton**".

A ligação do substrato inicia deslocamentos de próton que efetivamente transfere o próton hidroxila da Ser 195 para o Asp 102 (**Figura 7-7**). A nucleofilicidade aumentada do oxigênio do seril facilita seu ataque sobre o carbono da carbonila da ligação peptídica do substrato, formando um **intermediário acil-enzima** covalente. O próton no Asp 102 então se move por meio do His 57 até o grupamento amino liberado quando a ligação peptídica é clivada. A porção do peptídeo original com um grupamento amino livre deixa então o sítio ativo e é substituída por uma molécula de água. A rede de retransmissão de carga ativa a molécula de água ao retirar um próton por intermédio da His 57 para o Asp 102. O íon hidróxido resultante ataca o intermediário acil-enzima e um transportador de próton reverso retorna um próton para a Ser 195, restaurando seu estado original. Embora modificada durante o processo de catálise, a quimotripsina emerge inalterada ao término da reação. As proteases tripsina e elastase empregam um mecanismo catalítico similar, mas os membros dos resíduos em seu transportador de próton Ser-His-Asp diferem.

Frutose-2,6-bifosfatase

A frutose-2,6-bifosfatase, uma enzima reguladora da gliconeogênese (Capítulo 20), catalisa a liberação hidrolítica do fosfato no carbono 2 da frutose da frutose-2,6-bifosfato. A **Figura 7-8** ilustra os papéis dos sete resíduos de sítio ativo. A catálise envolve uma "tríade catalítica" de um resíduo Glu e dois His e um intermediário fosfo-histidil covalente.

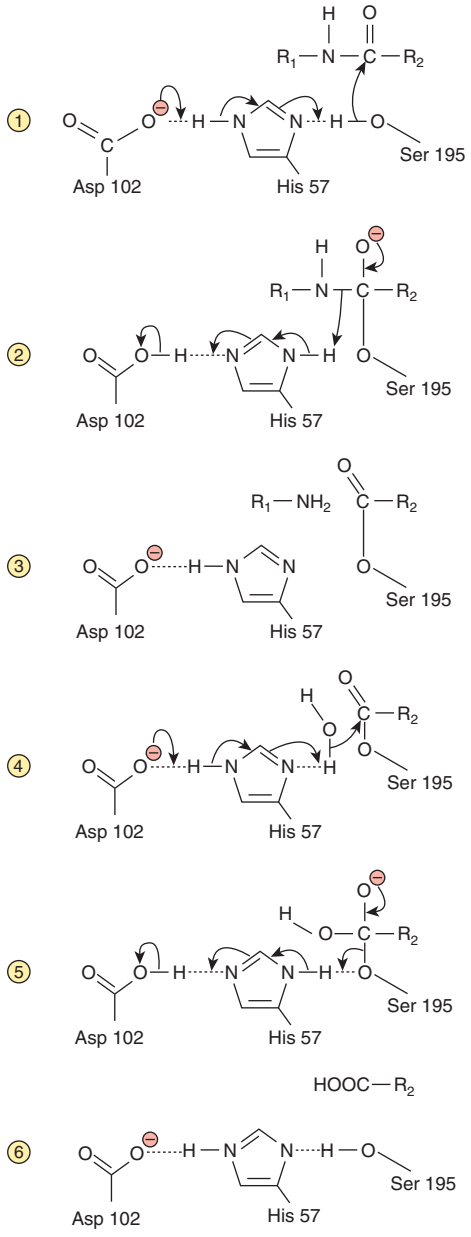


FIGURA 7-7 Catálise por quimotripsina. ① O sistema de retransmissão de carga remove um próton da Ser 195, tornando-a um nucleófilo mais forte. ② A Ser 195 ativada ataca a ligação peptídica, formando um intermediário tetraédrico transitório. ③ A liberação do peptídeo aminoterminal é facilitada pela doação de um próton para o grupamento amino recentemente formado pelo His 57 do sistema de retransmissão de carga, gerando um intermediário acil-Ser 195. ④ A His 57 e o Asp 102 colaboram para ativar uma molécula de água, a qual ataca o acil-Ser 195, formando um segundo intermediário tetraédrico. ⑤ O sistema de retransmissão de carga doa um próton para Ser 195, facilitando a clivagem do intermediário tetraédrico para liberar o peptídeo do terminal carboxila ⑥.

OS RESÍDUOS CATALÍTICOS SÃO ALTAMENTE CONSERVADOS

Os membros de uma família de enzimas como as aspartato ou serina proteases empregam um mecanismo similar para catalisar um tipo de reação comum, mas agem sobre diferentes substratos. A maioria das famílias de enzimas surge por meio de eventos de duplicação de gene que criaram uma segunda cópia do gene que codifica uma determinada enzima. As proteínas codificadas pelos dois genes podem então evoluir de maneira independente para reconhecer os diferentes substratos – resultando, por exemplo, em quimotripsina, que cliva as ligações peptídicas no lado da carboxila terminal de grandes aminoácidos hidrofóbicos, e na tripsina, que cliva as ligações peptídicas no lado carboxila terminal de aminoácidos básicos. Diz-se que as proteínas que se originam de

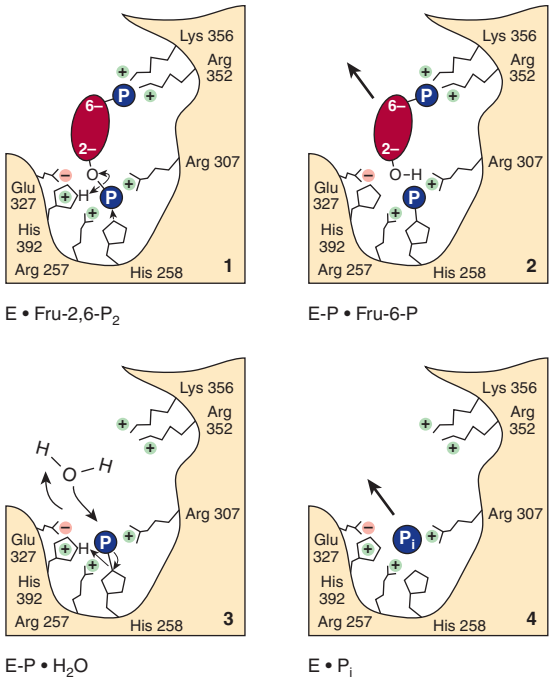


FIGURA 7-8 Catálise pela frutose-2,6-bifosfatase. (1) A Lys 356 e as Arg 257, 307 e 352 estabilizam a carga negativa quádrupla do substrato por meio de interações entre cargas. O Glu 327 estabiliza a carga positiva em His 392. (2) O nucleófilo His 392 ataca o grupamento fosforil C−2 e o transfere para a His 258, formando um intermediário fosforil-enzima. Agora, a frutose-6-fosfato deixa a enzima. (3) O ataque nucleofílico por uma molécula de água, possivelmente assistido pelo Glu 327 atuando como uma base, forma o fosfato inorgânico. (4) O ortofosfato inorgânico é liberado da Arg 257 e da Arg 307. (Reproduzida, com autorização, de Pilkis SJ, et al: 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: A metabolic signaling enzyme. Annu Ver Biochem 1995;64:779. © 1995 por Annual Reviews, www.annualreviews.org.)

um ancestral comum são **homólogas** entre si. A ancestralidade comum das enzimas pode ser deduzida a partir da presença de aminoácidos específicos na mesma posição em cada membro da família. Diz-se que esses resíduos são os **resíduos conservados**. A **Tabela 7-1** mostra a conservação estrutural primária de dois componentes da rede de retransmissão de carga para diversas serina-proteases. Dentre os resíduos mais altamente conservados estão aqueles que participam diretamente na catálise.

AS ISOENZIMAS SÃO FORMAS DE ENZIMA DISTINTAS QUE CATALISAM A MESMA REAÇÃO

Com frequência, os organismos superiores elaboram diversas versões fisicamente distintas de uma determinada enzima, cada uma das quais catalisa a mesma reação. Como os membros de outras famílias de proteínas, essas proteínas catalisadoras ou **isoenzimas** se originam por meio da duplicação do gene. As isoenzimas podem exibir diferenças sutis nas propriedades como a sensibilidade a determinados fatores reguladores (Capítulo 9) ou a afinidade ao abstrato (p. ex., hexoquinase ou glicoquinase) que as adaptam a tecidos ou circunstâncias específicas. Algumas isoenzimas também podem aumentar a sobrevida ao proporcionar uma cópia de segurança de uma enzima essencial.

A ATIVIDADE CATALÍTICA DAS ENZIMAS FACILITA SUA DETECÇÃO

As quantidades relativamente pequenas das enzimas presentes nas células complicam a determinação de sua presença e concentração. No entanto, a amplificação conferida por sua capacidade de transformar rapidamente milhares de moléculas de um substrato específico em produtos incute cada enzima com a capacidade de revelar sua presença. Os ensaios da atividade catalítica das enzimas são muitas vezes utilizados nos laboratórios clínicos e na pesquisa. Sob determinadas circunstâncias (ver Capítulo 8), a velocidade da reação catalítica que está sendo monitorada é proporcional à quantidade da enzima existente, o que permite que se deduza a sua concentração.

Enzimologia de molécula única

A sensibilidade limitada dos ensaios enzimáticos tradicionais exige a utilização de um grande grupo, ou um conjunto, de moléculas da enzima a fim de produzir quantidades mensuráveis do produto. Dessa maneira, os dados obtidos refletem a capacidade catalítica média de cada molécula. Recentes avanços na **nanotecnologia** possibilitaram a observação, comumente por microscopia com fluorescência, de eventos catalíticos envolvendo moléculas de substrato e enzimas individuais. Assim, os cientistas podem agora medir a velocidade de eventos catalíticos únicos e, por vezes, as etapas individuais na catálise por meio de um processo chamado de **enzimologia de molécula única**.

TABELA 7–1 Sequências de aminoácidos na vizinhança de sítios catalíticos de algumas proteases bovinas

Enzima	Sequências vizinhas à serina Ⓢ														Sequências vizinhas à histidina Ⓗ											
Tripsina	D	S	C	Q	D	G	Ⓢ	G	G	P	V	V	C	S	G	K	V	V	S	A	A	Ⓗ	C	Y	K	S	G
Quimotripsina A	S	S	C	M	G	D	Ⓢ	G	G	P	L	V	C	K	K	N	V	V	T	A	A	Ⓗ	G	G	V	T	T
Quimotripsina B	S	S	C	M	G	D	Ⓢ	G	G	P	L	V	C	Q	K	N	V	V	T	A	A	Ⓗ	C	G	V	T	T
Trombina	D	A	C	E	G	D	Ⓢ	G	G	P	F	V	M	K	S	P	V	L	T	A	A	Ⓗ	C	L	L	Y	P

Nota: As regiões mostradas são aquelas encontradas em qualquer lado do sítio catalítico.

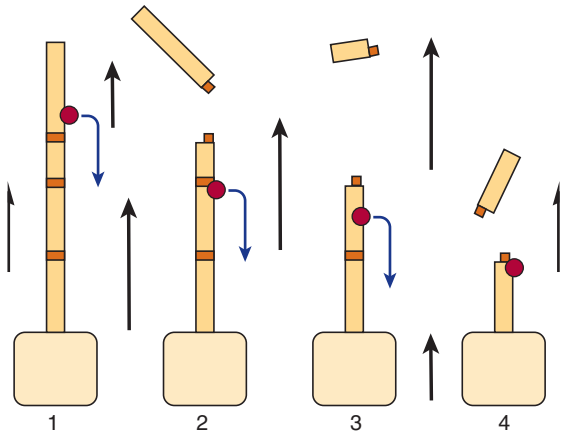


FIGURA 7-9 Observação direta de eventos de clivagem de DNA isolados catalisados por uma endonuclease de restrição. As moléculas do DNA imobilizadas por esferas (amarelo-claro) são colocadas em um fluxo corrente de tampão (setas pretas), o que as fazem assumir uma conformação estendida. A clivagem em um dos sítios de restrição (laranja) por uma endonuclease leva a um encurtamento da molécula de DNA, o que pode ser observado diretamente em um microscópio desde que as bases de nucleotídeo no DNA sejam fluorescentes. Embora a endonuclease (vermelho) não fluoresça e, por isso, seja invisível, a maneira progressiva pela qual a molécula de DNA é encurtada (1 → 4) revela que a endonuclease se liga à extremidade livre da molécula de DNA e se movimenta ao longo dela de um sítio para outro.

A descoberta de fármacos requer ensaios enzimáticos adequados para a triagem automatizada em alta escala

As enzimas constituem uma das principais classes de biomoléculas visadas para o desenvolvimento de fármacos e de outros agentes terapêuticos. Por exemplo, muitos antibióticos inibem enzimas que são únicas para patógenos microbianos. A descoberta de novos fármacos é muito facilitada quando um grande número de farmacóforos potenciais pode ser examinado de uma maneira rápida e automatizada – um processo referido como a **triagem automatizada de alto rendimento** (**HTS**). Essa triagem apresenta a vantagem dos recentes avanços na robótica, na óptica, no processamento de dados e na microfluídica para empreender e analisar muitos milhares de ensaios simultâneos da atividade de uma determinada enzima. Os dispositivos de triagem de alto débito mais comumente utilizados empregam volumes de 4 a 100 μL em placas de plásticos com 96.384 ou 1.536 poços e um equipamento totalmente automatizado capaz de dispensar substratos, coenzimas, enzimas e inibidores potenciais em uma multiplicidade de combinações e concentrações. A triagem automatizada de alto rendimento é ideal para a pesquisa dos inúmeros produtos de **química combinatória**, a síntese simultânea de grandes bibliotecas de compostos químicos que contêm todas as possíveis combinações de um conjunto de precursores químicos. Os ensaios enzimáticos que produzem um produto cromogênico ou fluorescentes são ideais, pois os detectores ópticos são facilmente fabricados para permitir a rápida análise de múltiplas amostras. Atualmente, o equipamento sofisticado necessário para quantidades realmente grandes de ensaios está disponível apenas em indústrias farmacêuticas, laboratórios custeados pelo governo e universidades de pesquisa. Conforme descrito no Capítulo 8, o uso principal é a análise de compostos inibitórios, sendo o potencial final o uso como medicamentos.

Imunoensaios ligados à enzima

A sensibilidade dos ensaios enzimáticos pode ser explorada para detectar proteínas que carecem de atividade catalítica. Os **ensaios imunoabsorventes ligados à enzima** (ELISAs) são anticorpos ligados de forma covalente a uma "enzima repórter", como a fosfatase alcalina ou a peroxidase, cujos produtos são prontamente detectados, em geral, pela absorbância da luz ou por fluorescência. As amostras séricas ou outras amostras biológicas a serem testadas são colocadas em uma placa de microtitulação plástica, onde as proteínas aderem à superfície do plástico e são imobilizadas. Quaisquer áreas de absorbância remanescentes do poço são então "bloqueadas" ao se acrescentar uma proteína não antigênica, como a albumina sérica bovina. Uma solução de anticorpo ligado de forma covalente a uma enzima repórter é acrescentada em seguida. Os anticorpos aderem ao antígeno imobilizado e são, eles mesmos, imobilizados. O excesso de moléculas de anticorpo livre é então removido por lavagem. A presença e a quantidade do anticorpo ligado são então determinadas ao se acrescentar o substrato para a enzima repórter.

As desidrogenases NAD(P)-dependentes são examinadas por meios espectrofotométricos

As propriedades físico-químicas dos reagentes em uma reação catalisada por enzima ditam as opções para o ensaio da atividade enzimática. Os ensaios espectrofotométricos exploram a capacidade de um substrato ou produto para absorver a luz. As coenzimas reduzidas NADH e NADPH, escritas como NAD(P)H, absorvem a luz em um comprimento de onda de 340 nm, enquanto suas formas oxidadas $NAD(P)^+$ não o fazem (**Figura 7-10**). Quando o $NAD(P)^+$ é reduzido, a absorbância a 340 nm aumenta, assim, proporcionalmente – e em uma velocidade determinada por – à quantidade do NAD(P)H produzido. Em contrapartida, para uma desidrogenase que catalisa a oxidação do NAD(P)H, será observada uma diminuição na absorbância a 340 nm. Em cada caso, a velocidade da mudança na densidade óptica a 340 nm será proporcional à quantidade da enzima existente.

Muitas enzimas são avaliadas por meio do acoplamento a uma desidrogenase

O ensaio das enzimas cujas reações não são acompanhadas por uma alteração na absorbância ou na fluorescência geralmente é mais difícil. Em alguns casos, o produto ou o substrato remanescente podem ser transformados em um composto mais facilmente detectado. Em outros, o produto da reação pode precisar ser separado do substrato não reagido antes da medição. Uma estratégia alternativa consiste em idealizar um substrato sintético cujo produto absorve luz ou fluoresce. Por exemplo, o *p*-nitrofenil fosfato é um substrato artificial para determinadas fosfatases e para a quimotripsina que não absorve a luz visível. No entanto, após a hidrólise, o ânion *p*-nitrofenilato resultante absorve a luz a 419 nm.

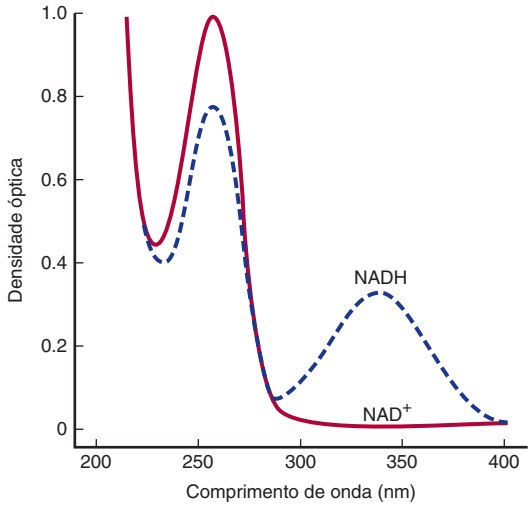


FIGURA 7-10 Espectros de absorção do NAD^+ e do NADH. As densidades são para a solução de 44 mg/L em uma célula com um trajeto luminoso de 1 cm. $NADP^+$ e NADPH possuem espectros análogos ao NAD^+ e ao NADH, respectivamente.

Outra conduta bastante genérica consiste em empregar um ensaio "acoplado" (**Figura 7-11**). Comumente, uma desidrogenase cujo substrato é o produto da enzima de interesse é adicionado em excesso catalítico. A velocidade de aparecimento ou desaparecimento do NAD(P)H depende, então, da velocidade da reação da enzima à qual a desidrogenase foi acoplada.

A ANÁLISE DE DETERMINADAS ENZIMAS AUXILIA O DIAGNÓSTICO

A análise das enzimas no plasma sanguíneo tem desempenhado um papel central no diagnóstico de diversos processos patológicos. Muitas enzimas são constituintes funcionais do sangue. Os exemplos incluem a pseudocolinesterase, a lipase lipoproteica, e os componentes da cascata que deflagram a coagulação sanguínea e a dissolução do coágulo. Outras enzimas são liberadas no plasma após a lesão ou morte celular. Embora estas últimas enzimas não realizem nenhuma função fisiológica no plasma, seu aparecimento ou seus níveis podem ajudar no diagnóstico e prognóstico das doenças e lesões que afetam tecidos específicos. Após a lesão, a concentração plasmática de uma enzima liberada pode subir de maneira precoce ou tardia, podendo diminuir de modo rápido ou lento. As proteínas advindas do citoplasma tendem a aparecer mais rapidamente que aquelas das organelas subcelulares. A velocidade com que as enzimas e outras proteínas são removidas do plasma varia com sua suscetibilidade à proteólise e com a permeabilidade através dos glomérulos renais.

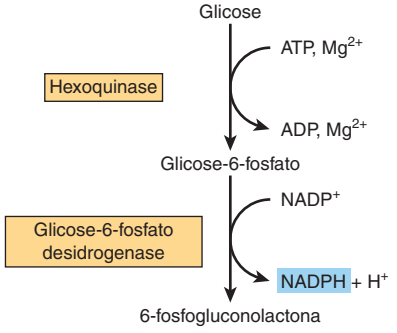


FIGURA 7-11 Ensaio enzimático acoplado para a atividade da hexoquinase. A produção de glicose-6-fosfato pela hexoquinase está acoplada à oxidação deste produto pela glicose-6-fosfato desidrogenase na presença da enzima adicionada e do $NADP^+$. Quando está presente um excesso de glicose-6-fosfato desidrogenase, a velocidade de formação do NADPH, que pode ser medida a 340 nm, é governada pela velocidade de formação da glicose-6-fosfato pela hexoquinase.

A análise quantitativa da atividade das enzimas liberadas ou de outras proteínas, comumente no plasma ou soro, mas também na urina ou em várias células, fornece informações relacionadas com o diagnóstico, prognóstico e com a resposta ao tratamento. Os ensaios da *atividade* enzimática muitas vezes empregam ensaios cinéticos padronizados das velocidades de reação iniciais. A **Tabela 7-2** lista diversas enzimas valiosas no diagnóstico clínico. No entanto, essas enzimas não são absolutamente específicas para a doença indicada. Por exemplo, os níveis sanguíneos elevados de fosfatase ácida prostática estão geralmente associados ao câncer de próstata, mas também com outros determinados cânceres e condições não cancerosas. Portanto, os dados dos ensaios enzimáticos devem ser considerados em conjunto com outros fatores percebidos por meio de um exame clínico abrangente. Os fatores a serem considerados na interpretação dos dados enzimáticos incluem a idade do paciente, o sexo, a história pregressa, o possível uso de medicamentos, e a sensibilidade e especificidade diagnósticas do teste enzimático.

TABELA 7–2 Principais enzimas séricas usadas no diagnóstico clínico

Enzima sérica	Principal uso diagnóstico
Aminotransferase	
Aspartato aminotransferase (AST ou SGOT)	Infarto do miocárdio
Alanina aminotransferase ALT ou SGPT)	Hepatite viral
Amilase	Pancreatite aguda
Ceruloplasmina	Degeneração hepatolenticular (doença de Wilson)
Creatina-quinase	Doenças musculares e infarto do miocário
γ-Glutamil transferase	Várias doenças hepáticas
Lactato desidrogenase Isoenzima 5	Doenças hepáticas
Lipase	Pancreatite aguda
Fosfatase, ácida	Carcinoma metastático da próstata
Fosfatase, alcalina (benzimas)	Várias doenças ósseas, doenças hepáticas obstrutivas

Nota: Muitas das enzimas acima não são específicas para a doença listada.

As enzimas auxiliam o diagnóstico do infarto do miocárdio

Uma enzima útil para a enzimologia diagnóstica deve ser relativamente específica para o tecido ou órgão sob estudo, deve aparecer no plasma ou em outro líquido em um momento útil para o diagnóstico (a "janela diagnóstica") e deve ser adequada para o ensaio automatizado. As enzimas utilizadas para confirmar um infarto do miocárdio (IM) ilustram o conceito de uma "janela diagnóstica", além de proporcionar uma perspectiva histórica sobre a utilização de diferentes enzimas para tal finalidade.

A detecção de uma enzima deve ser possível dentro de algumas horas em um IM para confirmar um diagnóstico preliminar e permitir o início da terapia apropriada. As enzimas que somente aparecem no plasma com 12 h ou mais após a lesão são, desta maneira, de utilidade limitada. As primeiras enzimas usadas para diagnosticar o IM foram a aspartato aminotransferase (AST), a alanina aminotransferase (ALT) e a lactato desidrogenase. No entanto, a AST e a ALT ficam abaixo do ideal, pois surgem no plasma de maneira relativamente lenta e não são específicas para o músculo cardíaco. Embora a LDH também seja liberada de forma relativamente lenta no plasma, ela propicia a vantagem da especificidade tecidual como uma consequência de sua estrutura quaternária.

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima tetramérica que consiste em dois tipos de monômeros: H (para o coração) e M (para o músculo) que se combinam para fornecer cinco isoenzimas da LDH: HHHH (I_1), HHHM (I_2), HHMM (I_3), HMMM (I_4) e MMMM (I_5). A expressão tecido-específica dos genes H e M determina as proporções relativas de cada subunidade em diferentes tecidos. A isoenzima I_1 predomina no tecido cardíaco, sendo que a isoenzima I_5 predomina no fígado. Assim, a lesão tecidual libera um padrão característico de isoenzimas LDH que pode ser separado por eletroforese e detectado com o emprego de um ensaio acoplado (**Figura 7-12**). Atualmente, a LDH foi superada como um marcador para o IM por outras proteínas que aparecem com maior rapidez no plasma.

A creatina-quinase (CK) possui três isoenzimas: CK-MM (músculo esquelético), CK-BB (cérebro) e CK-MB (coração e músculo esquelético). A CK-MB apresenta uma janela diagnóstica útil. Ela aparece dentro de 4 a 6 h de um IM, atinge o pico em 24 h e volta ao valor basal em torno de 48 a 72 h. Da mesma forma que a LDH, as isoenzimas de CK individuais são passíveis de separação por eletroforese, facilitando assim a detecção. O ensaio dos níveis plasmáticos de CK continua em uso para avaliar os distúrbios da musculatura esquelética, como a distrofia muscular de Duchenne. Contudo, hoje, na maioria dos laboratórios clínicos, a medição dos níveis plasmáticos de troponina substituiu a CK como o marcador diagnóstico preferido para o IM.

Troponinas

A **troponina** é um complexo de três proteínas envolvidas na contração muscular nos *músculos esquelético* e *cardíaco*, mas não na *musculatura lisa* (ver Capítulo 49). A medição imunológica dos níveis plasmáticos das troponinas cardíacas I e T proporciona indicadores sensíveis e específicos da lesão do músculo cardíaco. Os níveis de troponina aumentam em 2 a 6 h depois de um IM e permanecem elevados durante 4 a 10 dias. Além do IM, outras lesões do músculo cardíaco também elevam os níveis séricos de troponina. Dessa maneira, as troponinas cardíacas servem como um marcador de toda lesão do músculo cardíaco. A procura por marcadores adicionais da doença cardíaca, como a albumina modificada pela isquemia, e a avaliação simultânea de um espectro de marcadores diagnósticos por meio da proteômica, continuam a ser áreas ativas da pesquisa clínica.

As enzimas também podem ser empregadas no laboratório clínico como instrumentos para determinar a concentração de metabólitos críticos. Por exemplo, a glicose oxidase é muitas vezes utilizada para medir a concentração plasmática de glicose. As enzimas são empregadas com crescente frequência como instru-

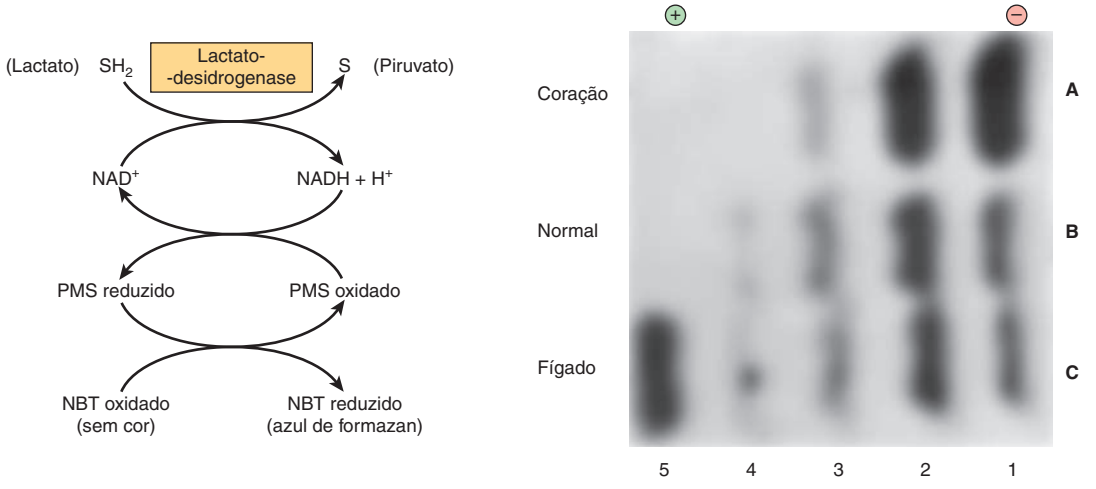


FIGURA 7-12 Padrões normal e patológico das isoenzimas da lactato desidrogenase (LDH) em soro humano. As isoenzimas séricas da LDH foram separadas por eletroforese e visualizadas usando o esquema de reações acopladas à esquerda. (NBT, azul nitro tetrazólio; PMS, metilsulfato de fenazina.) À direita está mostrado o eletroferograma marcado. O padrão A é o soro de um paciente com infarto do miocárdio; B é o soro normal; e C é o soro de um paciente com doença hepática. Os números arábicos denotam as isoenzimas específicas da LDH.

mentos para o tratamento da lesão e da doença. O ativador do plasminogênio tecidual (t-PA), ou a estreptoquinase, é utilizado no tratamento do IM agudo, enquanto a tripsina tem sido empregada no tratamento da fibrose cística (ver Capítulo 54).

AS ENZIMAS FACILITAM O DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS GENÉTICAS E INFECCIOSAS

Muitas técnicas de diagnóstico se beneficiam da especificidade e da eficiência das enzimas que atuam sobre os oligonucleotídeos como o DNA (Capítulo 39). As enzimas conhecidas como **endonucleases de restrição**, por exemplo, clivam o duplo filamento do DNA em sítios especificados por uma sequência de quatro, seis ou mais pares de bases chamados de **sítios de restrição**. A clivagem de uma amostra de DNA com uma enzima de restrição produz um conjunto característico de fragmentos de DNA menores (ver Capítulo 39). Os desvios no padrão de produto normal, chamados de **polimorfismos no comprimento de fragmento de restrição** (**RFLPs**), ocorrem quando uma mutação torna um sítio de restrição irreconhecível para sua endonuclease de restrição própria ou, de modo alternativo, gera um novo sítio de reconhecimento. Os RFLPs são atualmente utilizados para facilitar a detecção pré-natal de inúmeros distúrbios hereditários, inclusive o traço falciforme, a β-talassemia, a fenilcetonúria do lactente e a doença de Huntington.

A **reação em cadeia da polimerase** (**PCR**) emprega uma DNA-polimerase termoestável e se apropria de oligonucleotídeos *primers* para produzir milhares de cópias de um segmento definido do DNA a partir de uma quantidade diminuta de material inicial (ver Capítulo 39). A PCR possibilita que os cientistas médicos, biológicos e forenses detectem e caracterizem o DNA inicialmente presente em níveis muito baixos para a detecção direta. Além da triagem para as mutações genéticas, a PCR pode ser utilizada para detectar e identificar patógenos e parasitas como o *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas, e a *Neisseria meningitides*, o agente etiológico da meningite bacteriana, por meio da amplificação seletiva de seus DNAs.

O DNA RECOMBINANTE PROPICIA UM IMPORTANTE INSTRUMENTO PARA ESTUDAR AS ENZIMAS

A tecnologia do DNA recombinante surgiu como um importante adjunto no estudo das enzimas. Amostras de enzimas altamente purificadas são necessárias para o estudo de suas estruturas e funções. O isolamento de uma enzima individual, principalmente aquela presente em baixa concentração, a partir das milhares de proteínas presentes em uma célula, pode ser extremamente difícil. Se o gene para a enzima de interesse for clonado, geralmente é possível produzir grandes quantidades de sua proteína codificada na *Escherichia coli* ou em leveduras. Contudo, nem todas as proteínas animais podem ser expressas em uma forma ativa nas células microbianas, nem os micróbios realizam determinadas tarefas de processamento pós-tradução. Por estes motivos, um gene pode ser expresso em sistemas de células animais cultivadas empregando o vetor de expressão do baculovírus para transformar as células de inseto cultivadas. Para mais detalhes relacionados com as técnicas do DNA recombinante, ver Capítulo 39.

As proteínas de fusão recombinantes são purificadas por cromatografia de afinidade

A tecnologia do DNA recombinante também pode ser empregada para criar proteínas modificadas que são prontamente purificadas por meio da cromatografia de afinidade. O gene de interesse está ligado a uma sequência oligonucleotídica que codifica uma extensão carboxila ou aminoterminal à proteína codificada. A proteína modificada resultante, denominada **proteína de fusão**, contém um domínio modelado para interagir com um suporte de afinidade específico. Uma conduta popular consiste em prender um oligonucleotídeo que codifica seis resíduos de histidina consecutivos. A proteína "His-marcada" expressa se liga a suportes cromatográficos que contêm um íon metálico bivalente imobilizado, como Ni^{2+} ou Cd^{2+}. De forma alternativa, o domínio de ligação do substrato da glutationa-S-transferase (GST) pode servir como uma "etiqueta GST". A **Figura 7-13** ilustra a purificação de uma proteína de fusão GST usando um suporte de afinidade contendo a glutationa ligada. As proteínas de fusão também codificam frequentemente um sítio de clivagem para uma protease altamente específica, como a trombina, na região que liga as duas partes da proteína. Isso possibilita a remoção do domínio de fusão adicionado após a purificação por afinidade.

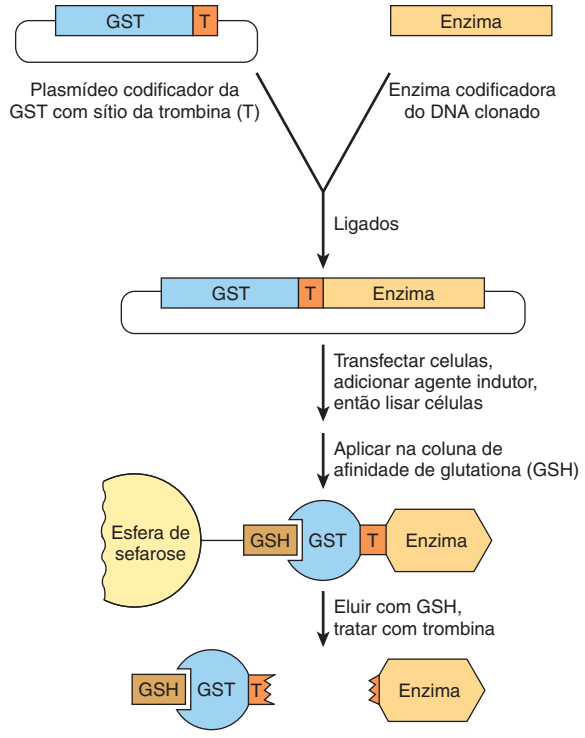


FIGURA 7-13 Uso de proteínas de fusão com a glutationa S-transferase (GST) para purificar proteínas recombinantes. (GSH, glutationa.)

A mutagênese sítio-dirigida proporciona entendimento sobre o mecanismo

Uma vez estabelecida a capacidade de expressar uma proteína a partir de seu gene clonado, é possível empregar a **mutagênese sítio-dirigida** para modificar resíduos aminoacil por meio da alteração de seus códons. Usada em combinação com as análises cinéticas e com a cristalografia por raios X, essa conduta facilita a identificação dos papéis específicos de determinados resíduos aminoacil na ligação e catálise do substrato. Por exemplo, a dedução de que um determinado resíduo aminoacil atua como um ácido genérico pode ser testada ao substituí-lo por um resíduo aminoacil incapaz de doar um próton.

RIBOZIMAS: ARTEFATOS A PARTIR DO MUNDO DO RNA

Cech descobriu a primeira molécula de RNA catalítica

A participação de enzimas catalisadoras na maturação pós-tradução de determinadas proteínas apresenta analogias no mundo do RNA. Muitas moléculas de RNA sofrem processamento que tanto remove segmentos do oligonucleotídeo quanto religam os segmentos remanescentes para formar o produto maduro (Capítulo 36). Nem todos esses catalisadores são, no entanto, proteínas. Enquanto examinava o processamento das moléculas de RNA ribossomal (rRNA) no protozoário ciliado *Tetrahymena*, Thomas Cech e seus colaboradores observaram, no início dos anos 1980, que o processamento do rRNA 26S prosseguia tranquilamente *in vitro*, mesmo perante a *ausência* total da proteína. A origem dessa atividade de *splicing* foi rastreada até um segmento catalítico de 413 pb que retinha sua atividade catalítica mesmo quando replicado em *E. coli* (Capítulo 39). Antes deste momento, acreditava-se que os polinucleotídeos serviam unicamente como entidades de armazenamento e transmissão de informações, e que a catálise estava restrita unicamente às proteínas.

Várias outras ribozimas foram descobertas desde então. A grande maioria catalisa as reações de deslocamento nucleofílico que visam às ligações fosfodiéster do esqueleto do RNA. Nos RNAs pequenos com autoclivagem, o nucleófilo de ataque é a água e o resultado é a hidrólise. Para as grandes ribozimas com íntron do grupo I, o nucleófilo de ataque é a 3′-hidroxila da ribose terminal de outro segmento do RNA e o resultado é uma reação de *splicing*.

O ribossomo – a ribozima final

A ribozima foi a primeira "máquina molecular" reconhecida. Um maciço complexo composto de grupos de subunidades de proteína e várias grandes moléculas de RNA ribossomal, o ribossomo realiza o processo altamente complexo e de vital importância de sintetizar longas cadeias polipeptídicas seguindo as instruções codificadas nas moléculas de RNA mensageiro (Capítulo 37). Durante muitos anos, supôs-se que os RNAs ribossomais desempenhavam um papel estrutural passivo, ou talvez ajudassem no reconhecimento dos RNAs cognatos por meio de um mecanismo de pareamento de bases.

A hipótese do mundo do RNA

A descoberta das ribozimas teve uma profunda influência sobre a teoria da evolução. Por muitos anos, os cientistas especulavam sobre como os primeiros catalisadores biológicos foram formados quando os aminoácidos contidos na sopa primordial coalesceram para formar as primeiras proteínas simples. Com a descoberta de que o RNA poderia tanto transportar informações quanto catalisar as reações químicas simples, surgiu uma nova hipótese do "Mundo do RNA", na qual o RNA constituiu a primeira macromolécula biológica. Mais adiante, surgiu o DNA como um oligonucleotídeo mais estável do ponto de vista químico para o armazenamento de informações por longo prazo, enquanto as proteínas, em virtude de sua variedade muito maior de grupamentos funcionais químicos, dominavam a catálise. Supondo-se que algum tipo de hibrido de RNA-proteína foi formado como um intermediário na transição do ribonucleotídeo para os catalisadores polipeptídicos, não precisa-se olhar além do ribossomo para encontrar a suposta ligação perdida.

Por que as proteínas não assumiram a totalidade das funções catalíticas? Supostamente, no caso do ribossomo, o processo foi muito complexo e essencial para permitir muitas oportunidades para que possíveis competidores obtivessem um espaço. No caso dos pequenos RNAs com autoclivagem e íntrons *auto-splicing*, eles podem representar um dos poucos casos em que a autocatálise do RNA é mais eficiente que o desenvolvimento de uma nova proteína catalisadora.

RESUMO

- As enzimas são catalisadores eficientes cuja especificidade rigorosa estende-se para o tipo de reação catalisada e, geralmente, para um único substrato.
- Os grupamentos prostéticos orgânicos e inorgânicos, cofatores e coenzimas desempenham papéis importantes na catálise. as coenzimas, muitas das quais são derivados das vitaminas B, servem como "transportadores" para os grupamentos frequentemente utilizados como aminas, elétrons e grupamentos acetil.
- Durante a catálise, as enzimas muitas vezes redirecionam as alterações conformacionais induzidas pelo substrato ligado para efetuar alterações complementares no substrato, as quais facilitam sua transformação no produto.
- Os mecanismos catalíticos empregados pelas enzimas incluem a introdução da tensão, a aproximação dos reagentes, a catálise acidobásica e a catálise covalente. A protease do HIV ilustra a catálise acidobásica; a quimotripsina e a frutose-2,6-bifosfatase ilustram a catálise covalente.
- Os resíduos aminoacil que participam na catálise são altamente conservados entre todas as classes de uma determinada enzima. A mutagênese sítio-dirigida, usada para mudar os resíduos suspeitos de ser importantes na catálise ou na ligação do substrato, proporciona descobertas sobre os mecanismos de ação da enzima.
- A atividade catalítica das enzimas revela sua presença, facilita sua detecção e propicia a base para os imunoensaios ligados a enzimas. Muitas enzimas podem ser examinadas por meio

espectrofotométrico ao se acoplá-las a uma desidrogenase $NAD(P)^+$-dependente.

- A química combinatorial gera extensas bibliotecas de inibidores e ativadores enzimáticos potenciais que podem ser testados por meio da triagem automatizada de alto rendimento.
- O ensaio das enzimas plasmáticas auxilia o diagnóstico e o prognóstico do infarto do miocárdio, a pancreatite aguda e diversas patologias ósseas e hepáticas.
- As endonucleases de restrição facilitam o diagnóstico das doenças genéticas ao revelar os polimorfismos no comprimento de fragmento de restrição, sendo que a reação em cadeia da polimerase (PCR) amplifica o DNA inicialmente presente em quantidades muito pequenas para a análise.
- A ligação de um poli-histidil, glutationa-S-transferase (GST) ou outra "etiqueta" na terminação N ou C de uma proteína recombinante facilita sua purificação por meio da cromatografia por afinidade em um suporte sólido que contenha um ligante imobilizado como um cátion divalente (p. ex., Ni^{2+}) ou GST. Em seguida, proteases específicas podem remover as "etiquetas" de afinidade e produzir a enzima original.
- Nem todas as enzimas são proteínas. São conhecidas diversas ribozimas que podem cortar e religar as ligações fosfodiéster do RNA. No ribossomo, é o rRNA, e não os componentes polipeptídicos, os principais responsáveis pela catálise.

REFERÊNCIAS

Brik A, Wong C-H: HIV-1 protease: mechanism and drug discovery. Org Biomol Chem 2003;1:5.

Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.* 4th ed. Elsevier, 2006.

Cornish PV, Ha T: A survey of single-molecule techniques in chemical biology. ACS Chem Biol 2007;2:53.

Doudna JA, Lorsch JR: Ribozyme catalysis: not different, just worse. Nature Struct Biol 2005;12:395.

Frey PA, Hegeman AD: *Enzyme Reaction Mechanisms.* Oxford University Press. 2006.

Geysen HM, Schoenen F, Wagner D, Wagner R: Combinatorial compound libraries for drug discovery: an ongoing challenge. Nature Rev Drug Disc 2003;2:222.

Goddard J-P, Reymond J-L: Enzyme assays for high-throughput screening. Curr Opin Biotech 2004;15:314.

Gupta S, de Lemos JA: Use and misuse of cardiac troponins in clinical practice. Prog Cardiovasc Dis 2007;50:151.

Hedstrom L: Serine protease mechanism and specificity. Chem Rev 2002;102:4501.

Melanson SF, Tanasijevic MJ: Laboratory diagnosis of acute myocardial injury. Cardiovascular Pathol 2005;14:156.

Pereira DA, Williams JA: Origin and evolution of high throughput screening. Br J Pharmacol 2007;152:53.

RenŽ AWF, Titman CM, Pratap CV, et al: A molecular switch and proton wire synchronize the active sites in thiamine enzymes. Science 2004;306:872.

Schmeing TM, Ramakrishnan V: What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. Nature 2009; 461:1234.

Schafer B, Gemeinhardt H, Greulich KO: Direct microscopic observation of the time course of single-molecule DNA restriction reactions. Agnew Chem Int Ed 2001;40:4663.

Silverman RB: *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions.* Academic Press, 2002.

Sundaresan V, Abrol R: Towards a general model for protein-substrate stereoselectivity. Protein Sci 2002;11:1330.

Todd AE, Orengo CA, Thornton JM: Plasticity of enzyme active sites. Trends Biochem Sci 2002;27:419.

Urich T, Gomes CM, Kletzin A, et al: X-ray structure of a self-compartmentalizing sulfur cycle metalloenzyme. Science 2006;311:996.

Walsh CT: *Enzymatic Reaction Mechanisms.* Freeman, 1979.

CAPÍTULO

8

Enzimas: Cinética

Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever o espectro e as finalidades gerais do estudo da cinética da enzima.
- Indicar se ΔG, a variação total na energia livre para uma reação, depende do mecanismo da reação.
- Apontar se ΔG é uma função das *velocidades* das reações.
- Explicar a relação entre K_{eq}, concentrações de substratos e produtos em equilíbrio, e a proporção das constantes de velocidade k_1/k_{-1}.
- Delinear como a temperatura e a concentração dos íons hidrogênio, enzima e substrato afetam a velocidade de uma reação catalisada por enzima.
- Assinalar por que a medição laboratorial da velocidade de uma reação catalisada por enzima geralmente emprega as condições de velocidade inicial.
- Referir a aplicação das formas lineares da equação de Michaelis-Menten na determinação de K_m e da $V_{máx}$.
- Fornecer uma explicação sobre por que uma forma linear da equação de Hill é usada para avaliar a cinética de ligação do substrato exibida por algumas enzimas multiméricas.
- Contrastar os efeitos de uma concentração crescente de substrato sobre a cinética da inibição competitiva e não competitiva simples.
- Caracterizar as maneiras pelas quais os substratos se acrescentam, e os produtos se separam, de uma enzima que segue um mecanismo de pingue-pongue, e fazem o mesmo em relação a uma enzima que segue um mecanismo de equilíbrio rápido.
- Elucidar a utilidade da cinética da enzima na determinação da modalidade de ação de medicamentos.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A **cinética da enzima** é o campo da bioquímica relacionado com a medição quantitativa das velocidades das reações catalisadas por enzima e com o estudo sistemático dos fatores que afetam essas velocidades. A análise cinética pode revelar o número e a ordem das etapas individuais pelas quais as enzimas transformam os substratos em produtos. Juntamente com a mutagênese sítio-dirigida e outras técnicas que sondam a estrutura da proteína, as análises cinéticas podem revelar detalhes do mecanismo catalítico de uma determinada enzima.

Um conjunto completo e balanceado das atividades enzimáticas é de fundamental importância para a manutenção da homeostasia. Uma compreensão da cinética da enzima é, desta maneira, importante para compreender como os estresses fisiológicos, como a anoxia, acidose ou alcalose metabólica, toxinas, e os agentes farmacológicos afetam esse equilíbrio. O envolvimento de enzimas em quase todos os processos fisiológicos as transforma nos alvos de escolha para medicamentos que curam ou melhoram a doença humana. A cinética enzimática aplicada representa o principal instrumento pelo qual os cientistas identificam e caracterizam os agentes terapêuticos que inibem seletivamente as velocidades de processos catalisados por enzimas específicas. Portanto, a cinética enzimática desempenha um papel central e crítico na descoberta de medicamentos e na farmacodinâmica comparativa, bem como na elucidação do modo de ação dos medicamentos.

AS REAÇÕES QUÍMICAS SÃO DESCRITAS USANDO EQUAÇÕES BALANCEADAS

Uma **equação química balanceada** lista as espécies químicas iniciais (substratos) presentes e as novas espécies químicas (produtos) formadas para uma determinada reação química, todas em suas proporções corretas ou em **estequiometria**. Por exemplo, a equação balanceada (1) descreve a reação de uma molécula de cada um dos substratos A e B para formar uma molécula de cada um dos produtos P e Q:

$$A + B \rightleftarrows P + Q \quad \textbf{(1)}$$

As setas duplas indicam a reversibilidade, uma propriedade intrínseca de todas as reações químicas. Assim, para a reação (1), se A e B podem formar P e Q, então P e Q também podem formar A e B. A designação de um determinado reagente como um "substrato" ou "produto" é, portanto, algo arbitrária, pois os produtos para uma reação escrita em uma direção são os substratos para a reação inversa. Contudo, o termo "produto" é frequentemente utilizado para designar os reagentes cuja formação é favorecida do ponto de vista termodinâmico. As reações para as quais os fatores termodinâmicos favorecem fortemente a formação dos produtos para os quais a seta aponta geralmente são representadas com uma seta única, como se elas fossem "irreversíveis":

$$A + B \rightarrow P + Q \quad \textbf{(2)}$$

As setas unidirecionais também são empregadas para descrever reações nas células vivas, onde os produtos da reação (2) são consumidos de forma imediata por uma subsequente reação catalisada por enzima. Portanto, a rápida remoção do produto P ou Q impede efetivamente a ocorrência da reação inversa, tornando a equação (2) **funcionalmente irreversível sob condições fisiológicas**.

AS ALTERAÇÕES NA ENERGIA LIVRE DETERMINAM A DIREÇÃO E O ESTADO DE EQUILÍBRIO DAS REAÇÕES QUÍMICAS

A variação de energia livre ΔG de Gibbs (também chamada de energia livre ou de energia de Gibbs) descreve tanto a *direção* em que uma reação química tenderá a prosseguir, quanto as concentrações dos reagentes e produtos que estarão presentes no equilíbrio. O ΔG para uma reação química é igual ao somatório das energias livres da formação dos produtos da reação ΔG_p menos o somatório das energias livres da formação dos substratos ΔG_s. O ΔG^0 indica a variação na energia livre que acompanha a transição a partir do estado padrão, as concentrações de um molar de substratos e produtos, para o equilíbrio. Um termo bioquímico mais útil é $\Delta G^{0'}$, que define o ΔG^0 em um estado padrão de 10^{-7} M de prótons, pH 7,0 (Capítulo 11). Quando a energia livre da formação dos produtos é menor que aquela dos substratos, os sinais de ΔG^0 e $\Delta G^{0'}$ serão negativos, indicando que a reação conforme escrita é favorecida na direção da esquerda para a direita. Essas reações são referidas como **espontâneas**. O **sinal** e a **magnitude** da variação de energia livre determinam até onde prosseguirá a reação. A equação (3) ilustra a relação entre a constante de equilíbrio K_{eq} e ΔG^0:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{eq} \quad \textbf{(3)}$$

onde R é a constante gasosa (1,98 cal/mol°K ou 8,31 J/mol°K) e T é a temperatura absoluta em graus Kelvin. K_{eq} é igual ao produto das concentrações dos produtos da reação, cada qual elevado à potência de sua estequiometria, dividido pelo produto dos substratos, cada qual elevado à potência de sua estequiometria:

Para a reação $A + B \rightleftarrows P + Q$

$$K_{eq} = \frac{[P][Q]}{[A][B]} \quad \textbf{(4)}$$

e para a reação (5)

$$A + A \rightleftarrows P \quad \textbf{(5)}$$

$$K_{eq} = \frac{[P]}{[A]^2} \quad \textbf{(6)}$$

o ΔG^0 pode ser calculado a partir da equação (3) quando as concentrações molares dos substratos e produtos presentes em equilíbrio são conhecidas. Quando o ΔG^0 é um número negativo, K_{eq} será maior que a unidade e as concentrações dos produtos em equilíbrio superarão aquelas dos substratos. Quando o ΔG^0 é positivo, a K_{eq} será inferior à unidade e a formação de substratos será favorecida.

Observe que, como ΔG^0 é uma função exclusivamente dos estados inicial e final das espécies reagentes, ele pode fornecer informações apenas sobre a *direção* e o *estado de equilíbrio* da reação. O ΔG^0 independe do **mecanismo** da reação e, assim, não fornece informações a respeito das ***velocidades*** das reações. Consequentemente – e explicado adiante – embora uma reação possa ter um grande ΔG^0 ou $\Delta G^{0'}$, ela pode, apesar disso, acontecer em uma velocidade desprezível.

AS VELOCIDADES DAS REAÇÕES SÃO DETERMINADAS POR SUA ENERGIA DE ATIVAÇÃO

As reações prosseguem por meio de estados de transição

O conceito do **estado de transição** é fundamental para compreender as bases químicas e termodinâmicas da catálise. A equação (7) demonstra uma reação de transferência de grupamento em que um grupamento E afluente desloca um grupamento L efluente, inicialmente ligado a *R*:

$$E + R - L \rightleftarrows E - R + L \quad \textbf{(7)}$$

O resultado global deste processo é a transferência do grupamento R de L para E. Na trajetória desse deslocamento, a ligação entre R e L foi enfraquecida, mas ainda não foi totalmente desfeita, sendo que a nova ligação entre E e R ainda não está completamente formada. Esse intermediário transitório – no qual não existe o substrato livre, nem o produto – é denominado de **estado de transição**,

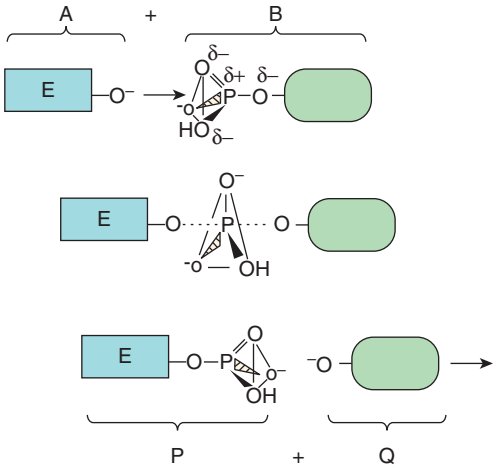


FIGURA 8-1 Formação de um estado de transição intermediário durante uma reação química simples, A + B → P + Q. São mostrados os três estágios de uma reação química em que um grupamento fosforil é transferido ao deixar o grupamento L entrar no grupamento E. Em cima, o grupamento E afluente (A) se aproxima de outro reagente, L-fosfato (B). Observe como os três átomos de oxigênio ligados por linhas triangulares e o átomo de fósforo do grupamento fosforil formam uma pirâmide. Centro: à medida que E se aproxima do L-fosfato, a nova ligação entre E e o grupamento fosfato começa a se formar (linha pontilhada), enquanto a ligação L ao grupamento fosfato se enfraquece. Estas ligações formadas parcialmente são indicadas pelas linhas pontilhadas. Embaixo: a formação do novo produto, E-fosfato (P), está agora completa, enquanto o grupamento efluente L (Q) sai. Observe como a geometria do grupamento fosforil difere entre o estado de transição e o substrato ou produto. Observe como o fósforo e os três átomos de oxigênio que ocupam os quatro cantos de uma pirâmide no substrato e no produto se tornam coplanares, conforme enfatizado pelo triângulo, no estado de transição.

E···R···L. As linhas pontilhadas representam as ligações "parciais" que estão sofrendo formação e ruptura. A **Figura 8-1** fornece uma ilustração mais detalhada do intermediário do estado de transição formado durante a transferência de um grupamento fosforil.

Pode-se pensar na reação (7) sendo composta por duas "reações parciais", com a primeira correspondendo à formação (F) e a segunda ao decaimento (D) subsequente do intermediário do estado de transição. Da mesma forma em todas as reações, as alterações características na energia livre, ΔG_F e ΔG_D, estão associadas a cada reação parcial:

$$E + R - L \rightleftarrows E\cdots R\cdots L \quad \Delta G_F \qquad \textbf{(8)}$$

$$E\cdots R\cdots L \rightleftarrows E - R + L \quad \Delta G_D \qquad \textbf{(9)}$$

$$E + R - L \rightleftarrows E - R + L \quad \Delta G = \Delta G_F + \Delta G_D \qquad \textbf{(10)}$$

Para a reação geral (10), ΔG é o somatório de ΔG_F e ΔG_D. Como para qualquer equação de dois termos, não é possível deduzir de ΔG quer o sinal, quer a magnitude de ΔG_F ou de ΔG_D.

Muitas reações envolvem múltiplos estados de transição, cada qual com uma mudança na energia livre associada. Para essas reações, o ΔG total representa o somatório de *todas* as mudanças na energia livre associadas à formação e ao decaimento de *todos* os estados de transição. **Portanto, não é possível deduzir a partir do ΔG total o número ou o tipo de estados de transição por meio dos quais a reação acontece**. Dito de outra maneira, a termodinâmica total não nos diz nada a respeito da cinética.

O ΔG_F define a energia de ativação

Independente do sinal ou da magnitude do ΔG, o ΔG_F para a esmagadora maioria das reações químicas apresenta um sinal positivo. A formação dos intermediários do estado de transição exige, por conseguinte, superar as barreiras de energia. Por isso, para o ΔG_F alcançar um estado de transição é frequentemente denominado de **energia de ativação**, E_{act}. A facilidade – e, consequentemente, a frequência – com que essa barreira é superada está inversamente relacionada com a E_{act}. Os parâmetros termodinâmicos que determinam com qual *rapidez* uma reação acontece são os valores de ΔG_F para a formação dos estados de transição, por meio dos quais a reação tem lugar. Para uma reação simples, onde ∝ significa "proporcional a",

$$\text{Velocidade} \propto e^{-E_{act}/RT} \qquad \textbf{(11)}$$

A energia de ativação para que a reação prossiga na direção oposta àquela idealizada é igual a $-\Delta G_D$.

INÚMEROS FATORES AFETAM A VELOCIDADE DA REAÇÃO

A **teoria cinética** – também chamada de **teoria da colisão** – da cinética química afirma que para que duas moléculas reajam, elas (1) devem se aproximar dentro da distância de formação de ligação entre si, ou "colidir", e (2) devem possuir energia cinética suficiente para superar a barreira de energia para atingir o estado de transição. Portanto, deduz-se que qualquer coisa que aumente a *frequência* ou a *energia* da colisão entre os substratos aumentará a velocidade da reação em que eles participam.

Temperatura

A elevação da temperatura aumenta a energia cinética das moléculas. Conforme ilustrado na **Figura 8-2**, a quantidade total de moléculas cuja energia cinética excede a barreira de energia E_{act} (barra vertical) para a formação dos produtos aumenta a partir das temperaturas baixa (A) para intermediária (B) até alta (C). O aumento da energia cinética das moléculas também aumenta sua rapidez de movimento e, por consequência, a frequência com que elas colidem. Essa combinação de colisões mais frequentes e

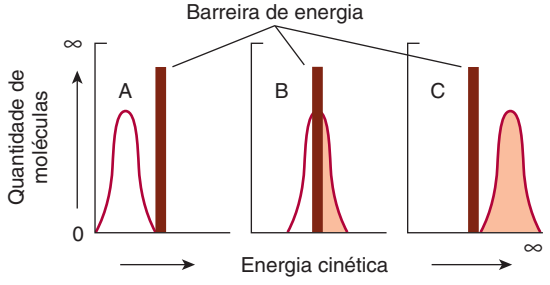


FIGURA 8-2 A barreira de energia para as reações químicas. (Ver discussão no texto.)

mais altamente energéticas, e, portanto, produtivas, aumenta a velocidade da reação.

Concentração do reagente

A frequência com que as moléculas colidem é diretamente proporcional às suas concentrações. Para duas moléculas diferentes A e B, a frequência com que elas colidem duplicará quando a concentração de A ou B for duplicada. Quando as concentrações tanto de A quanto de B são duplicadas, a probabilidade de colisão aumentará em quatro vezes.

Para que uma reação química que prossegue em temperatura constante envolvendo uma molécula de A e uma de B,

$$A + B \rightarrow P \quad \textbf{(12)}$$

o número de moléculas que possui energia cinética suficiente para superar a barreira da energia de ativação será uma constante. O número de colisões com energia suficiente para produzir P será, assim, diretamente proporcional ao número de colisões entre A e B e, portanto, às suas concentrações molares, indicadas pelos colchetes:

$$\text{Velocidade} \propto [A][B] \quad \textbf{(13)}$$

De maneira similar, para a reação representada por

$$A + 2B \rightarrow P \quad \textbf{(14)}$$

que também pode ser escrita como

$$A + B + B \rightarrow P \quad \textbf{(15)}$$

A expressão da velocidade correspondente é

$$\text{Velocidade} \propto [A][B][B] \quad \textbf{(16)}$$

ou

$$\text{Velocidade} \propto [A][B]^2 \quad \textbf{(17)}$$

Para o caso geral, quando n moléculas de A reagem com m moléculas de B,

$$nA + mB \rightarrow P \quad \textbf{(18)}$$

a expressão da velocidade é

$$\text{Velocidade} \propto [A]^n [B]^m \quad \textbf{(19)}$$

Substituir o sinal de proporcionalidade por um sinal de igualdade pela introdução de uma **constante de velocidade *k*,** característico da reação sob estudo, gera as equações (20) e (21), nas quais os subscritos 1 e −1 se referem às reações anterógrada e retrógrada, respectivamente:

$$\text{Velocidade}_1 = k_1[A]^n[B]^m \quad \textbf{(20)}$$

$$\text{Velocidade}_{-1} = k_{-1}[P] \quad \textbf{(21)}$$

O somatório das proporções molares dos reagentes define a **ordem cinética** da reação. Considere a reação (5). O coeficiente estequiométrico para o único reagente A é 2. Portanto, a velocidade de produção de P é proporcional ao quadrado de [A] e se diz que a reação é de *segunda ordem* em relação ao reagente A. Neste caso, a reação total também é de *segunda ordem*. Por conseguinte, o k_1 é referido como uma *constante de velocidade de segunda ordem*.

A reação (12) descreve uma reação de segunda ordem simples entre dois reagentes distintos, A e B. O coeficiente estequiométrico para cada reagente é 1. Portanto, embora a ordem total da reação seja 2, diz-se que ela é de *primeira ordem* em relação a A e de *primeira ordem* em relação a B. No laboratório, a ordem cinética de uma reação em relação a um determinado reagente, referido como substrato ou reagente variável, pode ser determinada ao se manter a concentrações dos outros reagentes em uma concentração constante ou fixa em grande excesso em relação ao reagente variável. Sob essas *condições de pseudoprimeira ordem*, a concentração do reagente(s) fixo(s) permanece quase constante. Dessa maneira, a velocidade da reação dependerá exclusivamente da concentração do reagente variável, por vezes também chamado de reagente limitador. Os conceitos da ordem de reação e das condições de pseudoprimeira ordem não se aplicam apenas às reações químicas simples, mas também às reações catalisadas por enzima.

O K_{eq} é uma proporção das constantes de velocidade

Embora todas as reações químicas sejam, em alguma extensão, reversíveis, as concentrações *totais* dos reagentes e produtos permanecem constantes no equilíbrio. Em equilíbrio, a velocidade de conversão dos substratos em produtos se iguala, por consequência, à velocidade em que os produtos são convertidos em substratos:

$$\text{Velocidade}_1 = \text{Velocidade}_{-1} \quad \textbf{(22)}$$

Portanto,

$$k_1[A]^n[B]^m = k_{-1}[P] \quad \textbf{(23)}$$

e

$$\frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[P]}{[A]^n[B]^m} \quad \textbf{(24)}$$

A proporção de k_1 para k_{-1} é denominada de constante de equilíbrio, K_{eq}. As seguintes propriedades são muito importantes de um sistema em equilíbrio.

1. A constante de equilíbrio é uma proporção das *constantes de velocidade* da reação (não das *velocidades* de reação).
2. Em equilíbrio, as *velocidades* de reação (não as *constantes de velocidade*) das reações anterógrada e retrógrada são iguais.
3. O equilíbrio é um estado *dinâmico*. Embora não exista alteração *global* na concentração dos substratos ou produtos, as moléculas individuais do substrato e produto estão sob interconversão contínua.
4. O valor numérico da constante de equilíbrio K_{eq} pode ser calculado tanto a partir das concentrações dos substratos e produtos em equilíbrio quanto da proporção k_1/k_{-1}.

A CINÉTICA DA CATÁLISE ENZIMÁTICA

As enzimas diminuem a barreira da energia de ativação para uma reação

Todas as enzimas aceleram as velocidades de reação ao diminuir o ΔG_F para a formação dos estados de transição. No entanto,

elas podem diferir na forma em que isso é obtido. Onde o mecanismo ou a sequência das etapas químicas no sítio ativo equivale essencialmente àquelas para que a mesma reação prossiga na ausência de um catalisador, **o ambiente do sítio ativo diminui o ΔG_F** ao estabilizar os intermediários do estado de transição. De outra maneira, a enzima pode ser visualizada ligando-se mais intensamente ao intermediário do estado de transição (Figura 8-1) que ela faz tanto com os substratos quanto com os produtos. Conforme discutido no Capítulo 7, a estabilização pode envolver (1) os grupamentos acidobásicos adequadamente posicionados para transferir prótons para ou do intermediário do estado de transição em desenvolvimento, (2) grupamentos carregados adequadamente posicionados ou íons metálicos que estabilizam as cargas em desenvolvimento, ou (3) a imposição da tensão estérica sobre os substratos, de tal maneira que a geometria deles se aproxime daquela do estado de transição. A protease do HIV (ver Figura 7-6) ilustra a catálise por uma enzima que diminui a barreira de ativação ao estabilizar um intermediário do estado de transição.

A catálise por enzimas que prossegue por meio de um mecanismo de reação *único* acontece, em geral, quando o intermediário do estado de transição forma uma ligação covalente com a enzima (**catálise covalente**). O mecanismo catalítico da serina protease quimotripsina (ver Figura 7-7) ilustra o modo pelo qual uma enzima utiliza a catálise covalente para prover uma via de reação única.

AS ENZIMAS NÃO AFETAM O K_{EQ}

Embora as enzimas sofram modificações transitórias durante o processo da catálise, elas sempre aparecem inalteradas ao término da reação. **Portanto, a presença de uma enzima não tem efeito sobre o ΔG^0 para a reação *total***, o que é uma função unicamente dos **estados inicial e final** dos reagentes. A equação (25) mostra a relação entre a constante de equilíbrio para uma reação e a mudança de energia livre padrão para aquela reação:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{eq} \qquad \textbf{(25)}$$

Este princípio é talvez mais facilmente ilustrado ao se incluir a presença da enzima (Enz) no cálculo da constante de equilíbrio para uma reação catalisada por enzima:

$$A + B + Enz \rightleftarrows P + Q + Enz \qquad \textbf{(26)}$$

Como a enzima em ambos os lados da seta dupla está presente em quantidade igual e forma idêntica, a expressão para a constante de equilíbrio,

$$K_{eq} = \frac{[P][Q][Enz]}{[A][B][Enz]} \qquad \textbf{(27)}$$

Reduz para uma reação idêntica àquela na ausência da enzima:

$$K_{eq} = \frac{[P][Q]}{[A][B]} \qquad \textbf{(28)}$$

Portanto, as enzimas não têm efeito sobre a K_{eq}.

MÚLTIPLOS FATORES AFETAM AS VELOCIDADES DAS REAÇÕES CATALISADAS POR ENZIMAS

Temperatura

A elevação da temperatura aumenta a velocidade das reações tanto não catalisadas quanto catalisadas por enzimas ao aumentar a energia cinética e a frequência de colisão das moléculas reagentes. No entanto, a energia calórica também pode aumentar a energia cinética da enzima até um ponto que exceda a barreira de energia para o rompimento das interações não covalentes que mantêm sua estrutura tridimensional. Então, a cadeia polipeptídica começa a se desdobrar, ou **desnaturar**, com uma perda acompanhante da atividade catalítica. A faixa de temperatura sobre a qual uma enzima mantém uma conformação estável e competente do ponto de vista catalítico depende – e comumente excede de modo moderado – da temperatura normal das células nas quais ela reside. As enzimas dos seres humanos geralmente exibem estabilidade em temperaturas de 45 a 55°C. Em contrapartida, as enzimas de microrganismos termofílicos que residem em correntes de águas vulcânicas ou em jatos hidrotermais suboceânicos podem ser estáveis em temperaturas iguais ou mesmo superiores a 100°C.

O **coeficiente de temperatura** ($\mathbf{Q_{10}}$) é o fator pelo qual a velocidade de um processo biológico leva a um aumento de 10°C na temperatura. Para as temperaturas em que as enzimas são estáveis, as velocidades da maioria dos processos biológicos comumente duplicam para uma elevação de 10°C na temperatura ($Q_{10} = 2$). As alterações nas velocidades das reações catalisadas por enzimas que acompanham uma elevação ou queda na temperatura corporal constituem um proeminente aspecto de sobrevivência para as formas de vida "de sangue frio", como lagartos ou peixes, cujas temperaturas corporais são ditadas pelo ambiente externo. No entanto, para os mamíferos e outros organismos homeotérmicos, as alterações nas velocidades da reação enzimática com a temperatura assumem importância fisiológica apenas em circunstâncias como a febre ou a hipotermia.

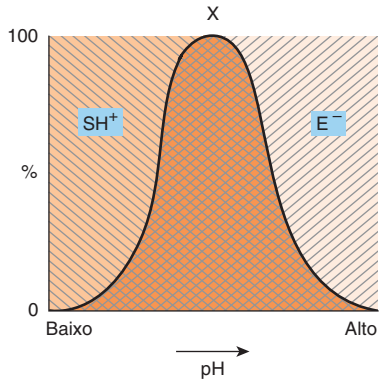


FIGURA 8-3 Efeito do pH sobre a atividade da enzima. Considere, por exemplo, a enzima negativamente carregada (E^-) que se liga a um substrato positivamente carregado (SH^+). É mostrada a proporção (%) de SH^+ [\\\] e de E^- [///] como uma função do pH. Apenas na área cruzada sombreada é que a enzima e o substrato comportam uma carga apropriada.

Concentração do íon hidrogênio

A velocidade de quase todas as reações catalisadas por enzimas exibe uma significativa dependência da concentração do íon hidrogênio. A maioria das enzimas intracelulares exibe atividade ótima em valores de pH entre 5 e 9. A relação da atividade com a concentração de íon hidrogênio (**Figura 8-3**) reflete o equilíbrio entre a desnaturação da enzima em pH alto ou baixo e os efeitos sobre o estado de carga da enzima, dos substratos ou de ambos. Para as enzimas cujo mecanismo envolve a catálise acidobásica, os resíduos envolvidos devem se encontrar no estado apropriado de protonação para que a reação continue. A ligação e o reconhecimento das moléculas do substrato com grupamentos dissociáveis muitas vezes também envolvem a formação de pontes salinas com a enzima. Os grupamentos carregados mais comuns são os grupamentos carboxilato (negativos) e as aminas protonadas (positivas). O ganho ou a perda de grupamentos carregados críticos afeta de maneira diversa a ligação e, assim, retardará ou abolirá a catálise.

OS ENSAIOS DE REAÇÕES CATALISADAS POR ENZIMAS COMUMENTE MEDEM A VELOCIDADE INICIAL

A maioria das medições das velocidades das reações catalisadas por enzimas emprega intervalos de tempo relativamente curtos, condições que se aproximam das **condições de velocidade inicial**. Sob essas condições, apenas resíduos do produto se acumulam, tornando a velocidade da reação inversa desprezível. A **velocidade inicial** (v_i) da reação é, dessa maneira, essencialmente idêntica à da velocidade da reação anterógrada. Os ensaios de atividade enzimática quase sempre empregam um grande excesso molar (10^3 a 10^7) de substrato em relação à enzima. Sob essas condições, v_i é proporcional à concentração da enzima. Medir a velocidade inicial permite, portanto, estimar a quantidade de enzima presente em uma amostra biológica.

A CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO AFETA A VELOCIDADE DA REAÇÃO

A seguir, as reações enzimáticas são tratadas como se elas tivessem apenas um substrato e um único produto. Para as enzimas

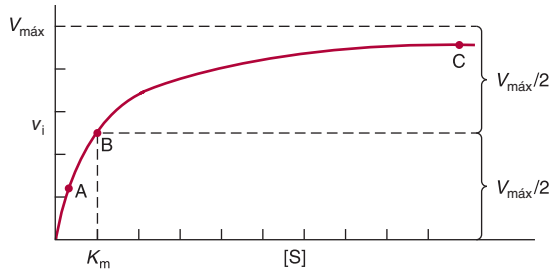


FIGURA 8-4 Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade inicial de uma reação catalisada por enzima.

com múltiplos substratos, os princípios discutidos se aplicam com igual validade. Ademais, ao empregar condições de pseudo-primeira ordem (ver anteriormente), os cientistas podem estudar a dependência da velocidade da reação sobre um reagente individual por meio da escolha apropriada de substratos fixos e variáveis. Em outras palavras, sob condições de pseudoprimeira ordem, o comportamento de uma enzima de múltiplos substratos imitará aquela que possui um substrato único. Contudo, neste caso, a constante de velocidade observada será uma função da constante de velocidade k_i para a reação, bem como da concentração do substrato(s) fixo(s).

Para uma enzima comum, à medida que a concentração do substrato é aumentada, a v_i aumenta até que alcance um valor máximo $V_{máx}$ (**Figura 8-4**). Quando elevações adicionais na concentração do substrato não aumentam mais a v_i, diz-se que a enzima está "saturada" pelo substrato. Observe que a forma da curva que relaciona a atividade com a concentração do substrato (Figura 8-4) é hiperbólica. Em um determinado instante qualquer, apenas as moléculas de substrato que estão combinadas com a enzima como um complexo enzima-substrato (ES) podem ser transformadas em um produto. Como a constante de equilíbrio para a formação do complexo enzima-substrato não é infinitamente grande, apenas uma fração da enzima pode estar presente como um complexo ES, mesmo quando o substrato está presente em excesso (pontos A e B da **Figura 8-5**). Nos pontos A ou B, aumentar ou diminuir [S], portanto, aumentará ou diminuirá o número de complexos ES com uma alteração correspondente na v_i. Contudo, no ponto C (Figura 8-5), quase toda a enzima está presente como o complexo ES. Como nenhuma enzima livre permanece disponível para formar o ES, os aumentos adicionais em

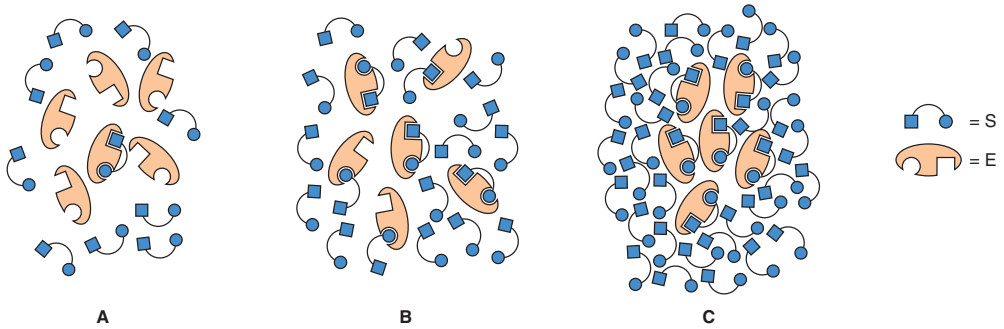


FIGURA 8-5 Representação de uma enzima na presença de uma concentração de substrato que está abaixo de K_m (A), em uma concentração igual a K_m (B) e em uma concentração muito superior a K_m (C). Os pontos A, B e C correspondem àqueles pontos na Figura 8-4.

[S] não podem aumentar a velocidade da reação. Sob essas condições de saturação, a v_i depende unicamente – e, dessa maneira, é limitada por – da rapidez com a qual o produto se dissocia da enzima, de modo que ela possa se combinar a mais substrato.

AS EQUAÇÕES DE MICHAELIS-MENTEN E HILL MODELAM OS EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO

A equação de Michaelis-Menten

A equação de Michaelis-Menten (29) ilustra em termos matemáticos a relação entre a velocidade de reação inicial v_i e a concentração do substrato [S], mostrada graficamente na Figura 8-4:

$$v_i = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + [S]} \qquad \textbf{(29)}$$

A constante de Michaelis K_m é a concentração de substrato em que v_i é a metade da velocidade máxima ($V_{máx}/2$) passível de obtenção em uma determinada concentração da enzima. Assim, K_m possui as dimensões da concentração do substrato. A dependência da velocidade de reação inicial de [S] e K_m pode ser ilustrada ao se avaliar a equação de Michaelis-Menten sob três condições.

1. Quando a [S] é muito menor que a K_m (ponto A nas Figuras 8-4 e 8-5), o termo $K_m + [S]$ é quase igual a K_m. Substituir $K_m + [S]$ por K_m reduz a equação (29) para

$$v_i = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + [S]} \quad v_i \approx \frac{V_{máx}[S]}{K_m} \approx \left(\frac{V_{máx}}{K_m}\right)[S] \qquad \textbf{(30)}$$

onde ≈ significa "aproximadamente igual a". Como $V_{máx}$ e K_m são, ambos, constantes, sua proporção é uma constante. Em outras palavras, quando [S] está consideravelmente abaixo de K_m, a v_i é proporcional a $k[S]$. Portanto, a velocidade de reação inicial é diretamente proporcional a [S].

2. Quando a [S] é muito maior que K_m (ponto C nas Figuras 8-4 e 8-5), o termo K_m é essencialmente igual à [S]. Substituir $K_m + [S]$ reduz a equação (29) para

$$v_i = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + [S]} \quad v_i \approx \frac{V_{máx}[S]}{[S]} \approx V_{máx} \qquad \textbf{(31)}$$

Desta maneira, quando a [S] supera muito a K_m, a velocidade de reação é máxima ($V_{máx}$) e não é afetada por aumentos adicionais na concentração do substrato.

3. Quando $[S] = K_m$ (ponto B nas Figuras 8-4 e 8-5):

$$v_i = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{máx}[S]}{2[S]} = \frac{V_{máx}}{2} \qquad \textbf{(32)}$$

A equação (32) diz que, quando a [S] se iguala a K_m, a velocidade inicial é a metade da máxima. A equação (32) também revela que a K_m é – e pode ser determinada de maneira experimental a partir de – a concentração do substrato em que a velocidade inicial é a metade da máxima.

Uma forma linear da equação de Michaelis-Menten é utilizada para determinar K_m e a $V_{máx}$

A medição direta do valor numérico da $V_{máx}$, e, portanto, o cálculo da K_m, frequentemente requer altas concentrações de substrato impraticáveis para alcançar as condições de saturação. Uma forma linear da equação de Michaelis-Menten evita essa dificuldade e permite que a $V_{máx}$ e a K_m sejam extrapoladas a partir dos dados da velocidade inicial obtida em concentrações de substrato menos saturadoras. Inicie com a equação (29),

$$v_i = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + [S]} \qquad \textbf{(29)}$$

inverta

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m + [S]}{V_{máx}[S]} \qquad \textbf{(33)}$$

fatore

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m}{V_{máx}[S]} + \frac{[S]}{V_{máx}[S]} \qquad \textbf{(34)}$$

e simplifique

$$\frac{1}{v_i} = \left(\frac{K_m}{V_{máx}}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{máx}} \qquad \textbf{(35)}$$

A equação (35) é a equação para uma linha reta, $y = ax + b$, onde $y = 1/v_i$ e $x = 1/[S]$. Um gráfico de $1/v_i$ com y como uma função de $1/[S]$ como x fornece, portanto, uma linha reta, cuja interseção em y é $1/V_{máx}$ e cuja inclinação é $K_m/V_{máx}$. Esse gráfico é chamado de **gráfico de Lineweaver-Burk ou duplo-recíproco** (**Figura 8-6**). Colocar o termo y da equação (36) igual a zero e resolver x revela que a interseção x é $-1/K_m$:

$$0 = ax + b; \quad \text{portanto,} \quad x = \frac{-b}{a} = \frac{-1}{K_m} \qquad \textbf{(36)}$$

Dessa maneira, o K_m é mais prontamente calculado a partir da interseção x negativa.

A maior virtude do gráfico de Lineweaver-Burk é a facilidade com que ele pode ser utilizado para determinar os mecanismos cinéticos dos inibidores enzimáticos (ver adiante). Contudo, ao usar um gráfico duplo-recíproco para determinar as constantes cinéticas, é importante evitar a introdução de tendências por intermédio da aglomeração de dados em valores baixos de 1/[S]. Para evitar

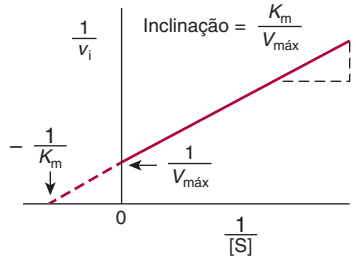


FIGURA 8-6 Gráfico duplo-recíproco ou de Lineweaver-Burk de $1/v_i$ *versus* 1/[S] usado para avaliar a K_m e a $V_{máx}$.

essa tendência, prepare uma solução do substrato cuja diluição em um ensaio produzirá a concentração máxima desejada do substrato. Agora, use o mesmo volume das soluções preparadas para diluir a solução armazenada em fatores de 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, etc. Em seguida, esses dados cairão sobre o eixo 1/[S] em intervalos de 1, 2, 3, 4, 5, etc. De modo alternativo, um gráfico duplo-recíproco, como o de Eadie-Hofstee (v_i *versus* vi/[S]) ou de Hanes-Woolf ([S]/v_i *versus* [S]), pode ser utilizado para minimizar a aglomeração.

A constante catalítica, k_{cat}

Diversos parâmetros podem ser empregados para comparar a atividade relativa de diferentes enzimas ou de diferentes preparações da mesma enzima. A atividade de preparações da enzima impuras comumente é expressa como uma *atividade específica* ($V_{máx}$ dividida pela concentração da proteína). Para uma enzima homogênea, podemos calcular seu *número de* turnover ($V_{máx}$ dividida pelos moles da enzima existentes). Contudo, quando se conhece o número de sítios ativos existentes, a atividade catalítica de uma enzima homogênea é mais bem expressa como sua *constante catalítica*, k_{cat} ($V_{máx}$ dividido pelo número de sítios ativos, S_t):

$$k_{cat} = \frac{V_{máx}}{S_t} \qquad \textbf{(37)}$$

Como as unidades de concentração se anulam, as unidades da k_{cat} são o inverso do tempo.

Eficiência catalítica, k_{cat}/K_m

Com qual medida a eficiência de diferentes enzimas, de diferentes substratos para uma determinada enzima, e a eficiência com a qual uma enzima catalisa uma reação nas direções anterógrada e inversa deve ser quantificada e comparada? Embora seja importante a capacidade máxima de uma determinada enzima para converter o substrato em produto, os benefícios de uma k_{cat} alta podem ser apenas imaginados quando a K_m é suficientemente baixa. Assim, a *eficiência catalítica* das enzimas é mais bem expressa em relação à proporção dessas duas constantes cinéticas, k_{cat}/K_m.

Para determinadas enzimas, quando o substrato se liga ao sítio ativo, ele é convertido no produto e liberado tão rapidamente que torna estes eventos efetivamente instantâneos. Para esses catalisadores excepcionalmente eficientes, a etapa limitadora da velocidade na catálise é a formação do complexo ES. Diz-se que essas enzimas são *limitadas por difusão* ou cataliticamente perfeitas, já que a velocidade mais rápida possível é determinada pela velocidade com que as moléculas se movimentam ou se difundem na solução. Os exemplos de enzimas para as quais a k_{cat}/K_m se aproxima do limite de difusão de $10^8 - 10^9\ M^{-1}s^{-1}$ incluem a triosefosfato isomerase, a anidrase carbônica, a acetilcolinesterase e a adenosina desaminase.

Nas células vivas, a aglomeração de enzimas que catalisam reações sucessivas em complexos multiméricos pode evitar as limitações impostas pela difusão. As relações geométricas das enzimas nesses complexos são tais que os substratos e os produtos não se difundem para dentro da massa da solução até que a última etapa na sequência das etapas catalíticas esteja completa. A ácido graxo sintetase estende esse conceito uma etapa adiante ao ligar de forma covalente a cadeia de ácido graxo do substrato em crescimento a uma biotina acoplada que roda de um sítio ativo para outro dentro do complexo até que a síntese de uma molécula de ácido palmítico esteja completa (Capítulo 23).

A K_m pode aproximar-se de uma constante de ligação

A afinidade de uma enzima por seu substrato é o inverso da constante de dissociação K_d para a dissociação do complexo enzima-substrato ES:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \qquad \textbf{(38)}$$

$$K_d = \frac{k_{-1}}{k_1} \qquad \textbf{(39)}$$

Dito de outra maneira, quanto *menor* for a tendência da enzima e de seu substrato para se *dissociarem*, *maior* será a afinidade da enzima por seu substrato. Embora a constante K_m de Michaelis frequentemente se aproxime da constante de dissociação K_d, nem sempre isto acontece. Para uma típica reação catalisada por enzima:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P \qquad \textbf{(40)}$$

O valor da [S] que confere $v_i = V_{máx}/2$ é

$$[S] = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m \qquad \textbf{(41)}$$

Quando $k_{-1} \gg k_2$, então

$$k_{-1} + k_2 \approx k_{-1} \qquad \textbf{(42)}$$

e

$$[S] \approx \frac{k_1}{k_{-1}} = K_d \qquad \textbf{(43)}$$

Portanto, $1/K_m$ apenas se aproxima de $1/K_d$ sob as condições em que a associação e a dissociação do complexo ES são rápidas em relação à catálise. Para as muitas reações catalisadas por enzima para as quais $k_{-1} + k_2$ **não** é aproximadamente igual a k_{-1}, o $1/K_m$ irá subestimar o $1/K_d$.

A equação de Hill descreve o comportamento das enzimas que exibem ligação cooperativa do substrato

Embora a maioria das enzimas demonstre a **cinética de saturação** simples exibida na Figura 8-4 e seja adequadamente descrita pela expressão de Michaelis-Menten, algumas enzimas se ligam a seus substratos de uma maneira **cooperativa**, análoga à ligação do oxigênio pela hemoglobina (Capítulo 6). O comportamento cooperativo é uma propriedade exclusiva das enzimas multiméricas que se ligam ao substrato em múltiplos sítios.

Para as enzimas que demonstram cooperatividade positiva ao se ligar ao substrato, a forma da curva que relaciona as alterações em v_i com as alterações na [S] é sigmoidal (**Figura 8-7**). Nem a expressão de Michaelis-Menten, nem seus gráficos derivados podem ser utilizados para avaliar a cinética cooperativa. Por-

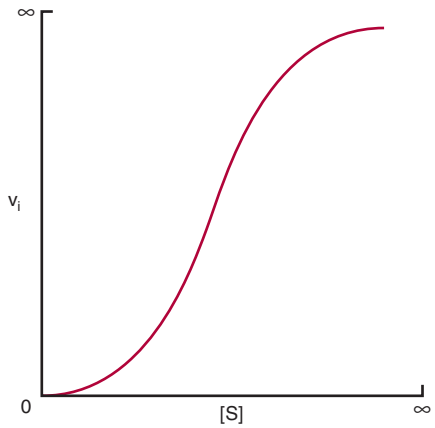


FIGURA 8-7 Representação da cinética de saturação sigmoidal do substrato.

tanto, os enzimologistas empregam uma representação gráfica da **equação de Hill**, originalmente derivada para descrever a ligação cooperativa do O_2 pela hemoglobina. A equação (44) representa a equação de Hill disposta em uma forma que prediz uma linha reta, onde k' é uma constante complexa:

$$\frac{\log v_i}{V_{máx} - v_i} = n \log [S] - \log k' \qquad \textbf{(44)}$$

A equação (44) demonstra que, quando a [S] é baixa em relação a k', a velocidade de reação inicial aumenta como a *enésima* potência de [S].

Um gráfico de log $v_i/(V_{máx} - v_i)$ *versus* log [S] fornece uma linha reta (**Figura 8-8**), onde a inclinação da linha ***n*** é o **coeficiente de Hill**, um parâmetro empírico cujo valor é uma função do número, tipo e força das interações de múltiplos sitos de ligação de substrato na enzima. Quando $n = 1$, todos os sítios de ligação se comportam de forma independente e se observa o comportamento cinético de Michaelis-Menten. Se n for maior que 1, diz-se que a enzima exibe cooperatividade positiva. A ligação do substrato a um sítio então aumenta a afinidade dos sítios restantes para ligar substratos adicionais. Quanto maior for o valor para

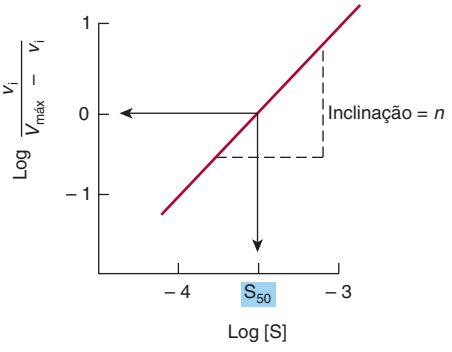


FIGURA 8-8 Uma representação gráfica de uma forma linear da equação de Hill é empregada para avaliar a S_{50}, a concentração de substrato que produz a metade da velocidade máxima, e o grau de cooperatividade *n*.

n, maior será o grau de cooperatividade e maior será a acentuação da sigmoide no gráfico de v_i *versus* [S]. Uma perpendicular tirada desde o ponto onde o termo y log $v_i/(V_{máx} - v_i)$ é zero faz interseção no eixo x em uma concentração de substrato denominada $\mathbf{S_{50}}$, a concentração de substrato que resulta em metade da velocidade máxima. Assim, a S_{50} é análoga à P_{50} para a ligação de oxigênio na hemoglobina (Capítulo 6).

A ANÁLISE CINÉTICA DIFERENCIA A INIBIÇÃO COMPETITIVA DA NÃO COMPETITIVA

Os inibidores das atividades catalíticas das enzimas fornecem tanto agentes farmacológicos quanto instrumentos de pesquisa para o estudo do mecanismo da ação da enzima. A força da interação entre um inibidor e a enzima depende de forças importantes na estrutura da proteína e na ligação do ligante (pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals; ver Capítulo 5). Os inibidores podem ser classificados com base em seu sítio de ação na enzima, pelo fato de se eles modificam quimicamente a enzima, ou com base nos parâmetros cinéticos que eles influenciam. Os compostos que mimetizam o estado de transição de uma reação catalisada por enzima (análogos do estado de transição) ou que captam a vantagem da maquinaria catalítica de uma enzima (inibidores baseados no mecanismo) podem ser inibidores particularmente potentes. Do ponto de vista cinético, diferencia-se duas classes de inibidores com base na superação ou não de inibição, devido ao aumento de concentração de substrato.

Os inibidores competitivos comumente se assemelham aos substratos

Os efeitos dos inibidores competitivos podem ser superados ao se elevar a concentração do substrato. De forma mais frequente, na inibição competitiva, o inibidor (**I**) se liga à porção de ligação do substrato do sítio ativo, bloqueando, assim, o acesso pelo substrato. As estruturas dos inibidores competitivos mais clássicos tendem, assim, a se assemelhar às estruturas de um substrato e, desta maneira, são chamados de **análogos de substrato**. A inibição da enzima succinato-desidrogenase pelo malonato ilustra a inibição competitiva por um análogo de substrato. A succinato-desidrogenase catalisa a remoção de um átomo de hidrogênio a partir de cada um dos dois carbonos metileno do succinato (**Figura 8-9**). Tanto o succinato quanto seu análogo estrutural malonato ($^-OOC—CH_2—COO^-$) podem se ligar ao sítio ativo da

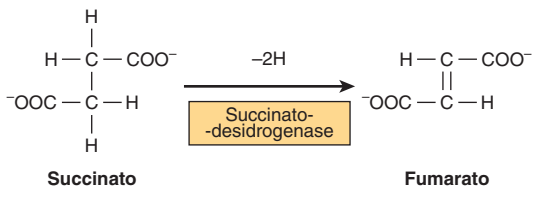


FIGURA 8-9 A reação da succinato-desidrogenase.

succinato-desidrogenase, formando um ES ou um complexo EI, respectivamente. No entanto, como o malonato contém apenas um carbono metileno, ele não pode sofrer desidrogenação.

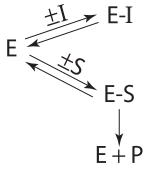
A formação e a dissociação do complexo EI é um processo dinâmico descrito por

$$E - I \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} E + I \qquad \textbf{(45)}$$

para a qual a constante de equilíbrio K_i é

$$K_i = \frac{[E][I]}{[E-I]} = \frac{k_i}{k_{-i}} \qquad \textbf{(46)}$$

Na verdade, **um inibidor competitivo age ao diminuir o número de moléculas de enzima livres disponíveis para se ligar ao substrato, isto é, para formar o ES e, desta forma, mais adiante, para formar o produto**, conforme descrito adiante.



Um inibidor competitivo e o substrato exercem efeitos recíprocos sobre a concentração dos complexos EI e ES. Como a formação dos complexos ES remove a enzima livre disponível para se combinar com o inibidor, aumentar a [S] diminui a concentração do complexo EI e eleva a velocidade da reação. A extensão em que a [S] deve ser aumentada para superar totalmente a inibição depende da concentração de inibidor presente, sua afinidade pela enzima, K_i e da afinidade, K_m, da enzima por seu substrato.

Gráficos duplo-recíproco facilitam a avaliação dos inibidores

Os gráficos duplo-recíproco diferenciam entre os inibidores competitivos e não competitivos e simplificam a avaliação das constantes de inibição. A v_i é determinada em diversas concentrações de substrato, tanto na presença quanto na ausência do inibidor. Para a inibição competitiva clássica, as linhas que conectam os pontos dos dados experimentais convergem no eixo y (**Figura 8-10**). Como a interseção y é igual a $1/V_{máx}$, este padrão indica que **quando 1/[S] se aproxima de 0, a v_i independe da presença do inibidor**. No entanto, observe que a interseção no eixo x varia com a concentração do *inibidor* – e que como $-1/K'_m$ é menor que $1/K_m$, o K'_m (o "K_m aparente") se torna maior na presença de concentrações crescentes do inibidor. Desta maneira, **um inibidor competitivo não tem efeito sobre a $V_{máx}$, porém eleva a K'_m, o K_m aparente, para o substrato**. Para uma simples inibição competitiva, a interseção no eixo x é

$$x = \frac{-1}{K_m}\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \qquad \textbf{(47)}$$

Quando a K_m for determinada na ausência do inibidor, a K_i pode ser calculada a partir da equação (47). Os valores de K_i são utilizados para comparar diferentes inibidores da mesma enzima. Quanto menor for o valor para K_i, mais efetivo será o inibidor. Por exemplo, os medicamentos do tipo estatina, que atuam como inibidores competitivos da HMG-CoA redutase (Capítulo 26), possuem várias ordens de magnitude menores que a K_m para o substrato HMG-CoA.

Os inibidores não competitivos simples diminuem a $V_{máx}$, mas não afetam a K_m

Na inibição não competitiva estrita, a ligação do inibidor não afeta a ligação do substrato. A formação de complexos tanto EI quanto EIS é, portanto, possível. No entanto, embora o complexo enzima-inibidor ainda possa se ligar ao substrato, sua eficiência para transformar o substrato em produto, refletido por $V_{máx}$, se mostra diminuída. Os inibidores não competitivos se ligam às enzimas em sítios distintos do sítio de ligação de substrato e, geralmente, comportam pouca ou nenhuma semelhança estrutural ao substrato.

Para a inibição não competitiva simples, E e EI possuem afinidade idêntica pelo substrato, e o complexo EIS gera o produto em uma velocidade desprezível (**Figura 8-11**). A inibição não competitiva mais complexa ocorre quando a ligação do inibidor *afeta* a afinidade aparente da enzima pelo substrato, causando a interceptação das linhas no terceiro ou quarto quadrante de um gráfico duplo-recíproco (não mostrado). Embora determinados inibidores exibam as características de uma mistura de inibição competitiva e não competitiva, a avaliação desses inibidores excede o espectro deste capítulo.

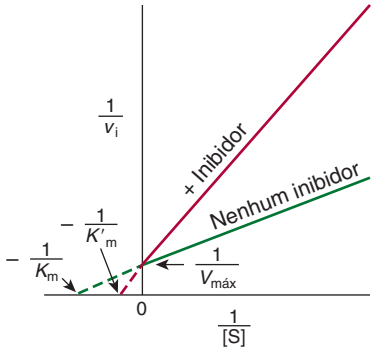


FIGURA 8-10 Gráfico de Lineweaver-Burk da inibição competitiva simples. Observe o alívio completo da inibição em [S] alta (i.e., 1/[S] baixa).

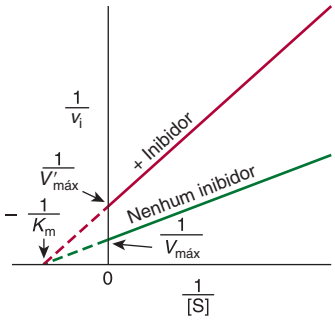


FIGURA 8-11 Gráfico de Lineweaver-Burk para a inibição não competitiva simples.

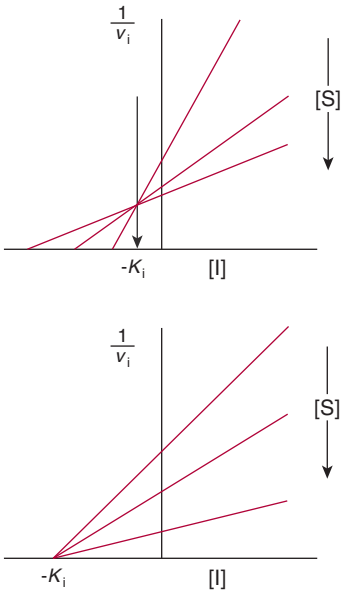


FIGURA 8-12 Aplicações dos gráficos de Dixon. Em cima: inibição competitiva, estimativa de K_i. Embaixo: inibição não competitiva, estimativa de K_i.

Gráfico de Dixon

Um gráfico de Dixon é por vezes empregado como uma alternativa para o gráfico de Lineweaver-Burk para determinar as constantes de inibição. A velocidade inicial (v_i) é medida em várias concentrações do inibidor, mas em uma concentração fixa do substrato (S). Para um inibidor competitivo ou não competitivo simples, um gráfico de $1/v_i$ *versus* a concentração do inibidor [I] fornece uma linha reta. O experimento é repetido em diferentes concentrações fixas do substrato. O conjunto resultante de linhas faz interseção à esquerda do eixo *y*. Para a inibição *competitiva*, uma perpendicular desenhada até o eixo *x,* a partir do ponto de interseção das linhas, fornece o $-K_i$ (**Figura 8-12**, em cima). Para a inibição *não competitiva*, a interseção no eixo *x* é $-K_i$ (**Figura 8-12**, embaixo). Com frequência, as publicações farmacêuticas empregam os gráficos de Dixon para ilustrar a potência comparativa dos inibidores competitivos.

IC_{50}

Uma alternativa menos rigorosa para o K_i como uma medida da potência inibitória é a concentração do inibidor que produz 50% de inibição, o **IC_{50}**. Diferente da constante de dissociação em equilíbrio K_i, o valor numérico da IC_{50} varia como uma função das circunstâncias específicas da concentração de substrato, etc., sob as quais ela é determinada.

Inibidores firmemente ligados

Alguns inibidores se ligam às enzimas com uma afinidade tão alta, $K_i \leq 10^{-9}$ M, que a concentração do inibidor necessário para medir K_i cai abaixo da concentração da enzima comumente presente em um ensaio. Sob essas circunstâncias, uma fração significativa do inibidor total pode estar presente como um complexo EI. Neste caso, isso vai contra a suposição, implícita na cinética de estado de equilíbrio clássica, de que a concentração de inibidor livre independe da concentração da enzima. A análise cinética desses inibidores firmemente ligados requer equações cinéticas especializadas que incorporam a concentração da enzima para estimar a K_i ou a IC_{50} e para diferenciar os inibidores competitivos dos não competitivos firmemente ligados.

Os inibidores irreversíveis "envenenam" as enzimas

Nos exemplos anteriores, os inibidores formam um complexo dinâmico dissociável com a enzima. A enzima totalmente ativa pode, portanto, ser recuperada simplesmente ao se remover o inibidor do meio adjacente. No entanto, vários outros inibidores agem de forma irreversível ao modificar quimicamente a enzima. Em geral, essas modificações envolvem fazer ou romper ligações covalentes com resíduos aminoacil essenciais para a ligação do substrato, catálise ou manutenção da conformação funcional da enzima. Como essas ligações covalentes são relativamente estáveis, uma enzima que foi "envenenada" por um inibidor irreversível, como um átomo de metal pesado ou um reagente acilante, permanece inibida mesmo depois da remoção do inibidor remanescente do meio adjacente.

Inibição com base no mecanismo

Os inibidores "com base no mecanismo" ou "suicidas" são análogos do substrato especializados que contêm um grupamento químico que pode ser transformado pela maquinaria catalítica da enzima alvo. Depois de se ligar ao sítio ativo, a catálise pela enzima gera um grupamento altamente reativo que forma uma ligação covalente com e **bloqueia a função de um resíduo cataliticamente essencial**. A especificidade e a persistência dos inibidores suicidas, que são tanto específicos para enzima e não são reativos fora dos limites do sítio ativo da enzima, os tornam líderes promissores para o desenvolvimento de medicamentos específicos para a enzima. A análise cinética dos inibidores suicidas se encontra além do espectro deste capítulo. Nem a conduta de Lineweaver-Burk nem a de Dixon são aplicáveis, pois os inibidores suicidas violam uma condição limitante primordial comum a ambas as condutas, a saber que a atividade da enzima não diminui durante o curso do ensaio.

A MAIORIA DAS REAÇÕES CATALISADAS POR ENZIMA ENVOLVE DOIS OU MAIS SUBSTRATOS

Embora diversas enzimas tenham um único substrato, muitas outras possuem dois – e por vezes mais – substratos e produtos. Os princípios fundamentais acima discutidos, embora ilustrados por enzimas com substrato único, também se aplicam a enzimas com múltiplos substratos. As expressões matemáticas utilizadas para avaliar as reações de múltiplos substratos são, no entanto, complexas. Embora uma análise detalhada da gama total das reações com múltiplos substratos exceda o espectro deste capítulo, alguns tipos comuns de comportamento cinético para reações de

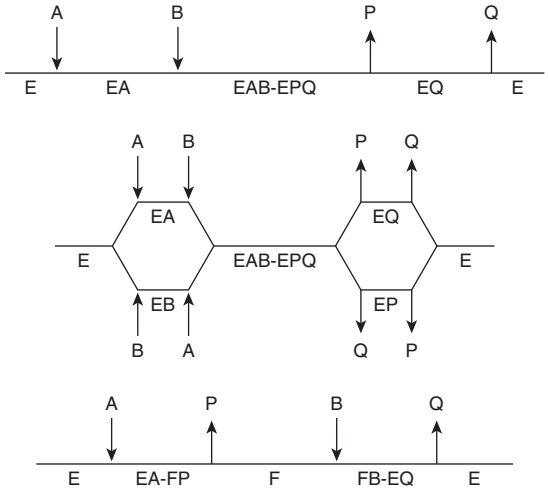


FIGURA 8-13 Representações de três classes de mecanismos de reação Bi-Bi. As linhas horizontais representam a enzima. As setas indicam a adição de substratos e a liberação de produtos. Em cima: uma reação Bi-Bi ordenada, característica de muitas oxidorredutases NAD(P)H-dependentes. Centro: uma reação Bi-Bi aleatória, característica de muitas quinases e algumas desidrogenases. Embaixo: uma reação em pingue-pongue, característica de aminotransferases e serino proteases.

dois substratos, dois produtos (denominadas reações "BiBi"), são consideradas adiante.

Reações sequenciais ou de deslocamento único

Nas **reações sequenciais**, ambos os substratos devem se combinar com a enzima para formar um complexo ternário antes que a catálise possa prosseguir (**Figura 8-13**, em cima). As reações sequenciais são por vezes referidas como as reações de deslocamento único, porque o grupamento que sofre a transferência comumente é passado diretamente, em uma única etapa, de um substrato para o outro. As reações Bi-Bi sequenciais podem ser adicionalmente diferenciadas com base em se os dois substratos se somam em uma ordem **aleatória** ou em uma ordem **compulsória**. Para as reações de ordem aleatória, tanto o substrato A quanto o substrato B podem se combinar primeiramente com a enzima para formar um complexo EA ou um complexo EB (**Figura 8-13**, centro). Para as reações de ordem compulsória, A deve se combinar primeiramente com E antes que B possa se combinar com o complexo EA. Uma explicação sobre por que algumas enzimas empregam mecanismos de ordem compulsória pode ser encontrada na hipótese de adaptação induzida de Koshland: a adição de A induz uma alteração conformacional na enzima que alinha os resíduos que reconhecem e ligam B.

Reações pingue-pongue

O termo "**pingue-pongue**" se aplica aos mecanismos em que um ou mais produtos são liberados a partir da enzima antes que todos os substratos tenham sido adicionados. As reações pingue-pongue envolvem a catálise covalente e uma forma modificada transitória da enzima (ver Figura 7-4). As reações Bi-Bi pingue-pongue são frequentemente referidas como as **reações de deslocamento duplo**. O grupamento que sofre a transferência é primeiramente deslocado do substrato A pela enzima para formar o produto P e uma forma modificada da enzima (F). A transferência do grupamento subsequente de F para o segundo substrato B, formando o produto Q e regenerando E, constitui o segundo deslocamento (**Figura 8-13**, embaixo).

A maioria das reações Bi-Bi obedece à cinética de Michaelis-Menten

A maioria das reações Bi-Bi obedece a uma forma um pouco mais complexa da cinética de Michaelis-Menten, na qual $V_{máx}$ se refere à velocidade da reação atingida quando ambos os substratos estão presentes em níveis saturantes. Cada substrato possui seu próprio valor de K_m característico, o qual corresponde à concentração que fornece metade da velocidade máxima quando o segundo substrato está presente em níveis saturantes. Da mesma forma que para as reações de substrato único, os gráficos duplo-recíproco podem ser empregados para determinar a $V_{máx}$ e a K_m. A v_i é medida como uma função de concentração de um substrato (o substrato variável), enquanto a concentração do outro substrato (o substrato fixo) é mantida constante. Quando as linhas obtidas para diversas concentrações de substrato fixo são plotadas no mesmo gráfico, é possível diferenciar um mecanismo de pingue-pongue, o qual fornece linhas paralelas (**Figura 8-14**) a partir de um mecanismo sequencial, o qual proporciona um padrão de linhas em interseção (não demonstrado).

Os **estudos de inibição de produto** são usados para complementar as análises cinéticas e para diferenciar entre as reações Bi-Bi ordenadas e aleatórias. Por exemplo, em uma reação Bi-Bi aleatória-ordenada, cada produto irá agir como um inibidor competitivo na ausência de seus coprodutos, independente de qual substrato é designado como o substrato variável. No entanto, para um mecanismo sequencial (Figura 8-13, em cima), apenas o

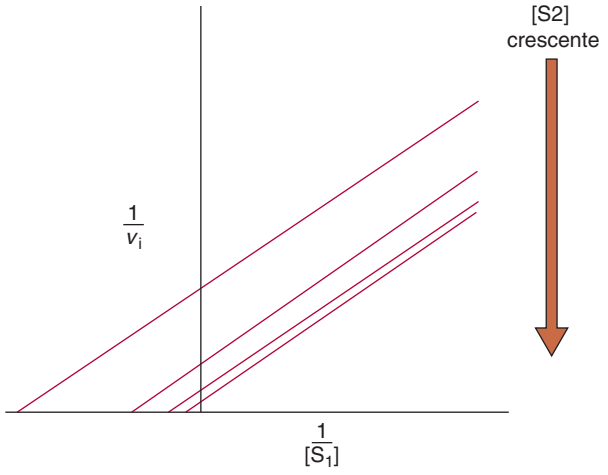


FIGURA 8-14 Gráfico de Lineweaver-Burk para uma reação em pingue-pongue com dois substratos. Um aumento na concentração de um substrato (S_1), enquanto a do outro substrato (S_2) PE é mantida constante por alterações nas interseções *y* e *x*, mas não na inclinação.

produto Q fornecerá o padrão indicativo da inibição competitiva quando A é o substrato variável, enquanto apenas o produto P produzirá este padrão com B como o substrato variável. As outras combinações do inibidor do produto e substrato variável produzirão formas de inibição não competitiva complexa.

O CONHECIMENTO DA CINÉTICA, DO MECANISMO E DA INIBIÇÃO DA ENZIMA AJUDA NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

Muitos fármacos agem como inibidores enzimáticos

O objetivo da farmacologia é o de identificar agentes que possam

1. Destruir ou comprometer o crescimento, a característica invasiva ou o desenvolvimento dos patógenos invasores.
2. Estimular os mecanismos de defesa endógenos.
3. Conter ou impedir os processos moleculares anormais disparados por estímulos genéticos, ambientais ou biológicos com perturbação mínima das funções celulares normais do hospedeiro.

Em virtude de seus diversos papéis fisiológicos e do alto grau de seletividade do substrato, as enzimas constituem alvos naturais para o desenvolvimento de agentes farmacológicos que tanto são potentes quanto específicos. Por exemplo, os fármacos do tipo estatina diminuem a produção de colesterol ao inibir a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (Capítulo 26), enquanto a entricitabina e o fumarato de disoproxil tenofovir bloqueiam a replicação do vírus da imunodeficiência humana ao inibir a transcriptase reversa viral (Capítulo 34). O tratamento farmacológico da hipertensão frequentemente inclui a administração de um inibidor da enzima conversora de angiotensina, diminuindo, assim, o nível de angiotensina II, um vasoconstritor (Capítulo 42).

A cinética da enzima define as condições de triagem apropriadas

A cinética da enzima desempenha um papel crucial na descoberta de medicamentos. O conhecimento do comportamento cinético da enzima de interesse é necessário, em primeiro lugar, para selecionar as condições apropriadas do ensaio para detectar a presença de um inibidor. Por exemplo, a concentração do substrato deve ser ajustada de tal modo que o produto suficiente seja produzido para permitir a detecção fácil da atividade da enzima sem ser tão alta que mascare a presença do inibidor. Em segundo lugar, a cinética da enzima fornece o meio para quantificar e comparar a potência de diferentes inibidores e definir a sua modalidade de ação. Os inibidores não competitivos são particularmente desejáveis, porque – em contraste com os inibidores competitivos – seus efeitos nunca podem ser totalmente superados por aumentos na concentração de substrato.

A maioria dos fármacos é metabolizada *in vivo*

O desenvolvimento de fármaco muitas vezes envolve mais que a avaliação cinética da interação dos inibidores com a enzima alvo. Os fármacos podem sofrer a ação de enzimas presentes no paciente ou no patógeno, um processo denominado **metabolismo do fármaco**. Por exemplo, a penicilina e outros antibióticos β-lactâmicos bloqueiam a síntese da parede celular ao intoxicar de forma irreversível a enzima alanil alanina carboxipeptidase-transpeptidase. Contudo, muitas bactérias produzem β-lactamases que hidrolisam a função β-lactâmica crítica na penicilina e nos fármacos relacionados. Uma estratégia para superar a resistência antibiótica resultante consiste em administrar simultaneamente um inibidor da β-lactamase com um antibiótico β-lactâmico.

A transformação metabólica é por vezes necessária para converter um precursor medicamentoso inativo, ou **pró-fármaco**, em sua forma biologicamente ativa (Capítulo 53). O ácido 2′-desoxi-5-fluorouridílico, um potente inibidor da timidilato sintetase, e alvo comum da quimioterapia contra o câncer, é produzido a partir da 5-fluorouracila por meio de uma série de transformações enzimáticas catalisadas por uma fosforribosil transferase e pelas enzimas da via de salvamento do desoxirribonucleosídeo (Capítulo 33). O projeto efetivo e a administração de pró-fármacos exigem o conhecimento da cinética e dos mecanismos das enzimas responsáveis por transformá-los em suas formas biologicamente ativas.

RESUMO

- O estudo da cinética da enzima – os fatores que afetam as velocidades das reações catalisadas por enzima – revela as etapas individuais pelas quais as enzimas transformam os substratos em produtos.
- A ΔG, a variação geral na energia livre para uma reação, independe do mecanismo da reação e não fornece informações relacionadas com as *velocidades* das reações.
- A K_{eq}, uma proporção das *constantes de velocidade* de reação, pode ser calculada a partir das concentrações de substratos e produtos em equilíbrio ou a partir da proporção k_1/k_{-1}. As enzimas não afetam a K_{eq}.
- As reações prosseguem por meio dos estados de transição para os quais a ΔG_F é a energia de ativação. Temperatura, concentração de íon hidrogênio, concentração da enzima, concentração do substrato e inibidores afetam, sem exceção, as velocidades das reações catalisadas por enzimas.
- A medição da velocidade de uma reação catalisada por enzima geralmente emprega as condições de velocidade iniciais, para as quais a ausência virtual do produto impede a reação reversa.
- As formas lineares da equação de Michaelis-Menten simplificam a determinação da K_m e da $V_{máx}$.
- Uma forma linear da equação de Hill é usada para avaliar a cinética de ligação de substrato cooperativa exibida por algumas enzimas multiméricas. A inclinação n, o coeficiente de Hill, reflete a quantidade, natureza e força das interações

dos sítios de ligação de substrato. Um valor de *n* maior que 1 indica a cooperatividade positiva.

- Os efeitos dos inibidores competitivos simples, que geralmente se assemelham aos substratos, são superados pela elevação da concentração do substrato. Os inibidores não competitivos simples diminuem a $V_{máx}$, mas não afetam a K_m.
- Para inibidores competitivos e não competitivos simples, a constante inibitória K_i é igual à constante de dissociação em equilíbrio para o complexo enzima-inibidor relevante. Um termo mais simples e menos rigoroso para avaliar a eficácia de um inibidor é IC_{50}, a concentração do inibidor que produz 50% de inibição sob as circunstâncias determinadas do experimento.
- Os substratos podem ser acrescentados em uma ordem aleatória (qualquer substrato pode se combinar em primeiro lugar com a enzima) ou em uma ordem compulsória (o substrato A deve ligar-se antes do substrato B).
- Nas reações em pingue-pongue, um ou mais produtos são liberados a partir da enzima antes que os substratos tenham sido adicionados.
- A cinética enzimática aplicada facilita a identificação e a caracterização dos fármacos que inibem seletivamente enzimas específicas. Desta maneira, a cinética enzimática desempenha um papel central e crítico na descoberta de fármacos, na farmacodinâmica comparativa e na determinação do modo de ação dos fármacos.

REFERÊNCIAS

Cook PF, Cleland WW: *Enzyme Kinetics and Mechanism.* Garland Science, 2007.

Copeland RA: *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery.* John Wiley & Sons, 2005.

Cornish-Bowden A: *Fundamentals of Enzyme Kinetics.* Portland Press Ltd, 2004.

Dixon M: The determination of enzyme inhibitor constants. Biochem J 1953;55:170.

Dixon M: The graphical determination of K_m and K_i. Biochem J 1972;129:197.

Fersht A: *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding.* Freeman, 1999.

Fraser CM, Rappuoli R: Application of microbial genomic science to advanced therapeutics. Annu Rev Med 2005;56:459.

Henderson PJF: A linear equation that describes the steady-state kinetics of enzymes and subcellular particles interacting with tightly bound inhibitors. Biochem J 1972;127:321.

Schramm, VL: Enzymatic transition-state theory and transitionstate analogue design. J Biol Chem 2007;282:28297.

Schultz AR: *Enzyme Kinetics: From Diastase to Multi-enzyme Systems.* Cambridge University Press, 1994.

Segel IH: *Enzyme Kinetics.* Wiley Interscience, 1975.

Wlodawer A: Rational approach to AIDS drug design through structural biology. Annu Rev Med 2002;53:595.

CAPÍTULO

9

Enzimas: Regulação das Atividades

Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Explicar o conceito da homeostasia corporal total e sua resposta às flutuações no ambiente externo.
- Discutir por que as concentrações celulares dos substratos para a maioria das enzimas tendem a ficar próximas de K_m.
- Listar os múltiplos mecanismos pelos quais se alcança o controle ativo do fluxo de metabólito.
- Descrever as vantagens de determinadas enzimas serem elaboradas como pró-enzimas.
- Ilustrar os eventos fisiológicos que deflagram a conversão de uma pró-enzima para a enzima ativa correspondente.
- Especificar as alterações estruturais típicas que acompanham a conversão de uma pró-enzima na enzima ativa.
- Referir as características básicas de um sítio de ligação comum para metabólitos e mensageiros secundários que regulam a atividade catalítica de determinadas enzimas.
- Indicar duas maneiras genéricas pelas quais um efetor alostérico pode modificar a atividade catalítica.
- Delinear os papéis das proteínas quinases, proteínas fosfatases e mensageiros reguladores e hormonais, bem como de mensageiros secundários na iniciação de um processo metabólico.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

O fisiologista do século XIX Claude Bernard enunciou a base conceitual para regulação metabólica. Ele observou que os organismos vivos respondem de maneira quantitativa e temporalmente apropriada para permitir que eles sobrevivam aos múltiplos desafios impostos por mudanças em seus ambientes externo e interno. Subsequentemente, Walter Cannon uniu o termo "homeostasia" para descrever a capacidade dos animais de manter um ambiente intracelular constante, apesar das alterações em seus ambientes externos. Atualmente, sabe-se que os organismos respondem às alterações em seus ambientes externo e interno por meio de ajustes balanceados e coordenados nas velocidades de reações metabólicas específicas. As perturbações da maquinaria sensor-resposta, responsável por manter o equilíbrio homeostático, pode ser danoso para a saúde humana. Por exemplo, o câncer, o diabetes, a fibrose cística e a doença de Alzheimer caracterizam-se, sem exceção, por disfunções reguladoras deflagradas por agentes patogênicos ou mutações genéticas. Muitos vírus oncogênicos produzem proteínas tirosina-quinases que modificam os eventos reguladores que controlam os padrões da expressão genética, contribuindo para o início e a progressão do câncer. A toxina do *Vibrio cholerae*, o agente etiológico do cólera, incapacita as vias de sensor-resposta nas células epiteliais intestinais por meio da ADP-ribosilação das proteínas de ligação do GTP (proteínas G), as quais ligam os receptores da superfície celular à adenilil-ciclase. A consequente ativação de ciclase leva a um fluxo irrestrito de água para dentro do intestino, resultando em diarreia maciça e desidratação. A *Yersinia pestis*, o agente etiológico da peste, produz uma proteína tirosina fosfatase que hidrolisa os grupamentos fosforil em proteínas citoesqueléticas primordiais. Acredita-se que as disfunções nos sistemas proteolíticos responsáveis pela degradação de proteínas defeituosas ou anormais desempenham uma função nas doenças neurodegenerativas, como a de Alzheimer e a de Parkinson. Além

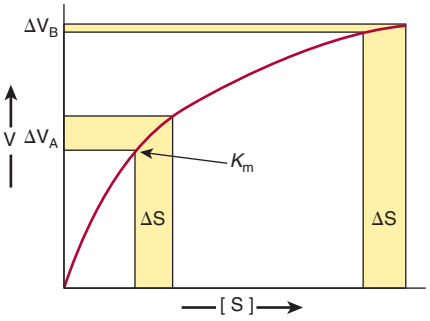


FIGURA 9-1 Resposta diferencial da velocidade de uma reação catalisada por enzima, ΔV, à mesma alteração de aumento na concentração de substrato em uma concentração de substrato próxima a K_m (ΔV_A) ou muito acima de K_m (ΔV_B).

de sua função imediata como reguladores da atividade enzimática, degradação proteica, etc., as modificações covalentes como a fosforilação, acetilação e ubiquitinação proporcionam um código, baseado na proteína, para o armazenamento e a transmissão hereditária das informações (Capítulo 35). Esses sistemas de informação independentes do DNA são referidos como **epigenéticos**. O conhecimento dos fatores que controlam as velocidades das reações catalisadas por enzimas é, desta maneira, essencial para uma compreensão da base molecular da doença e de sua transmissão. Este capítulo delineia os padrões pelos quais os processos metabólicos são controlados e fornece exemplos ilustrativos. Os capítulos subsequentes fornecem exemplos adicionais.

A REGULAÇÃO DO FLUXO DE METABÓLITO PODE SER ATIVA OU PASSIVA

As enzimas que atuam em sua velocidade máxima não podem responder a aumentos na concentração de substrato, podendo responder apenas a diminuições acentuadas na concentração de substrato. Os valores da K_m para a maioria das enzimas, portanto, tendem a ser próximos à concentração intracelular média de seus substratos, de tal modo que as alterações na concentração do substrato geram alterações correspondentes no fluxo de metabólito (**Figura 9-1**). As respostas às alterações no nível de substrato representam um meio importante, porém *passivo*, para coordenar o fluxo de metabólito e manter a homeostasia nas células quiescentes. No entanto, elas oferecem um espectro limitado para responder às alterações nas variáveis ambientais. Os mecanismos que regulam a eficiência da enzima de uma maneira *ativa* em resposta aos sinais internos e externos são discutidos adiante.

O fluxo de metabólito tende a ser unidirecional

Apesar da existência de oscilações de curto prazo nas concentrações do metabólito e nos níveis enzimáticos, as células vivas existem em um estado de equilíbrio dinâmico, no qual as concentrações médias dos intermediários metabólicos permanecem relativamente constantes com o tempo. Embora todas as reações químicas sejam reversíveis em alguma extensão, nas células vivas os produtos de reação servem como substratos para – e são removidos por – outras

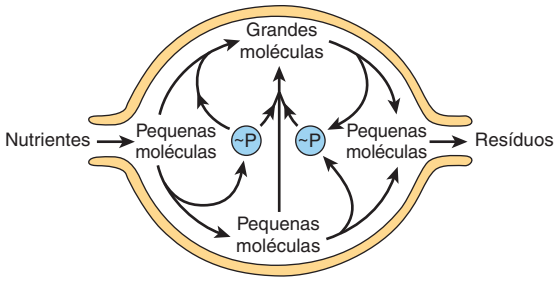


FIGURA 9-2 Uma célula idealizada em estado de equilíbrio. Observe que o fluxo de metabólito é unidirecional.

reações catalisadas por enzima (**Figura 9-2**). Muitas reações nominalmente reversíveis ocorrem, desta maneira, de modo unidirecional. Essa sucessão de reações metabólicas acopladas é acompanhada por uma variação total na energia livre, a qual favorece o fluxo unidirecional do metabólito (Capítulo 11). O fluxo unidirecional do metabólito por um percurso com uma grande variação negativa global na energia livre é análoga ao fluxo de água por um cano em que uma extremidade é menor que a outra. As curvas ou dobras no cano simulam as etapas individuais catalisadas por enzimas com uma pequena variação negativa ou positiva na energia livre. O fluxo de água pelo cano permanece, contudo, unidirecional devido à alteração total na altura, a qual corresponde à variação total na energia livre em um percurso (**Figura 9-3**).

A COMPARTIMENTALIZAÇÃO GARANTE A EFICIÊNCIA METABÓLICA E SIMPLIFICA A REGULAÇÃO

Nos eucariotos, as vias anabólica e catabólica que interconvertem produtos comuns podem ocorrer em compartimentos subcelulares específicos. Por exemplo, muitas das enzimas que degradam proteínas e polissacarídeos residem dentro de organelas chamadas lisossomos. De modo similar, a biossíntese do ácido graxo ocorre no citosol, enquanto a oxidação do ácido graxo acontece dentro da mitocôndria (Capítulos 22 e 23). A segregação de determinadas vias metabólicas dentro de tipos celulares especializados proporciona um meio adicional de compartimentalização física.

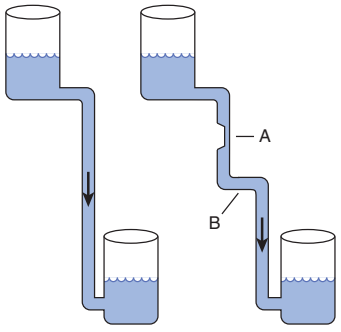


FIGURA 9-3 Analogia hidrostática para uma via com uma etapa limitante de velocidade (A) e uma etapa com um valor de ΔG próximo a 0 (B).

Convenientemente, muitas vias aparentemente antagônicas podem coexistir na ausência de barreiras físicas, desde que a termodinâmica imponha que cada uma prossiga com a formação de um ou mais *intermediários únicos*. Para qualquer reação, ou série de reações, a variação na energia total que acontece quando o fluxo do metabólito prossegue na direção "anterógrada" é igual, em magnitude, *porém com sinal oposto*, àquela necessária para prosseguir na direção inversa. Algumas enzimas dentro destas vias catalisam reações, como isomerizações, que podem atuar como catalisadores bidirecionais *in vivo*, pois a diferença na energia livre entre substratos e produtos fica próximo a zero. Contudo, elas representam a exceção em lugar da regra. Quase todas as vias metabólicas prosseguem por meio de uma ou mais etapas para as quais o ΔG é significativo. Por exemplo, a clivagem da glicose para formar duas moléculas de piruvato, a glicólise, tem um ΔG total favorável de -96 kJ/mol, um valor muito grande para simplesmente operar na direção "inversa" quando se deseja converter o excesso de piruvato em glicose. Consequentemente, a gliconeogênese prossegue por uma via em que as três etapas mais desfavorecidas do ponto de vista energético na glicólise são substituídas por novas reações catalisadas por enzimas distintas (Capítulo 20).

A capacidade das enzimas para discriminar entre as coenzimas estruturalmente similares NAD^+ e $NADP^+$ também resulta em uma forma de compartimentalização. As formas reduzidas de ambas as coenzimas não são prontamente distinguíveis. No entanto, as reações que geram e, mais adiante, consomem elétrons, as quais se destinam à produção de ATP, são segregadas no NADH, longe daquelas utilizadas nas etapas de redução de muitas vias de biossíntese, as quais são realizadas pelo NADPH.

Controlar uma enzima que catalisa uma reação limitante da velocidade regula uma via metabólica inteira

Embora o fluxo de metabólitos pelas vias metabólicas envolva a catálise por inúmeras enzimas, o controle ativo da homeostasia é realizado pela regulação apenas de um seleto subgrupo dessas enzimas. A enzima ideal para a intervenção reguladora é aquela cuja quantidade ou eficiência catalítica dita que a reação por ela catalisada é lenta em relação a todas as outras na via. Diminuir a eficiência catalítica ou a quantidade do catalisador responsável pelo "gargalo" ou pela **reação limitante da velocidade** reduz imediatamente o fluxo do metabólito por toda a via. Em contrapartida, um aumento em sua quantidade ou em sua eficiência catalítica aumenta o fluxo pela via como um todo. Por exemplo, a acetil-CoA carboxilase catalisa a síntese da malonil-CoA, a primeira reação comprometida com a biossíntese dos ácidos graxos (Capítulo 23). Quando a síntese da malonil-CoA é inibida, as reações subsequentes da síntese dos ácidos graxos cessam pela ausência de substrato. Como "governantes" naturais do fluxo metabólico, as enzimas que catalisam as etapas limitantes da velocidade também constituem alvos eficientes para a intervenção reguladora pelos medicamentos. Por exemplo, os medicamentos do tipo "estatina" cortam a síntese do colesterol ao inibir a HMG-CoA redutase, a qual catalisa a reação limitante da velocidade da colesterogênese.

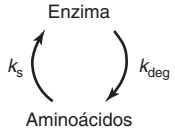
REGULAÇÃO DA QUANTIDADE DE ENZIMA

A capacidade catalítica da reação limitante da velocidade em uma via metabólica é o produto da concentração das moléculas da enzima e sua eficiência catalítica intrínseca. Por isso, deduz-se que a capacidade catalítica pode ser influenciada tanto ao se mudar a quantidade da enzima presente quanto por alterar sua eficiência catalítica intrínseca.

As proteínas são sintetizadas e degradadas de maneira contínua

Ao medir as velocidades de incorporação de aminoácidos ^{15}N-marcados na proteína e suas velocidades de perda de ^{15}N a partir da proteína, Schoenheimer deduziu que as proteínas corporais se encontram em um estado de "equilíbrio dinâmico", no qual elas são continuamente sintetizadas e degradadas – um processo referido como o ***turnover* proteico**. Isso se mantém mesmo para aquelas proteínas que estão presentes em um nível de estado de equilíbrio essencialmente constante, ou **constitutivo**, com o passar do tempo. Por outro lado, as concentrações de muitas enzimas são influenciadas por uma ampla gama de fatores fisiológicos, hormonais ou nutricionais.

A quantidade absoluta de uma enzima reflete o equilíbrio global entre sua velocidade de síntese e sua velocidade de degradação. Nos seres humanos, as alterações nos níveis de enzimas específicas podem ser efetuadas por uma mudança na constante de velocidade para os processos globais de síntese (k_s), degradação (k_{deg}) ou ambos.



Controle da síntese da enzima

A síntese de determinadas enzimas depende da presença de **indutores**, geralmente substratos ou compostos quimicamente relacionados que estimulam a transcrição do gene que os codificam (Capítulos 36 e 37). A *Escherichia coli* desenvolvida em meio de glicose, por exemplo, apenas cataboliza a lactose depois da adição de um β-galactosídeo, um indutor que deflagra a síntese de uma β-galactosidase e de uma galactosídeo permease (Figura 38-3). As enzimas induzíveis dos seres humanos incluem a triptofano pirrolase, treonina desidratase, tirosina-α-cetoglutarato aminotransferase, enzimas do ciclo da ureia, HMG-CoA redutase e citocromo P450. Em contrapartida, excesso de um metabólito pode impedir a síntese de sua enzima cognata por meio da **repressão**. A indução e a repressão envolvem elementos *cis*, sequências de DNA específicas localizadas acima dos genes regulados, e proteínas reguladoras de ação *trans*. Os mecanismos moleculares de indução e repressão são discutidos no Capítulo 38. A síntese de outras enzimas pode ser estimulada pela interação dos hormônios e de outros sinais extracelulares com receptores específicos na superfície celular. As informações detalhadas sobre o controle da síntese proteica em resposta aos estímulos hormonais podem ser encontradas no Capítulo 42.

Controle da degradação da enzima

Em animais, muitas proteínas são degradadas pela via da ubiquitina-proteossomo, cuja descoberta laureou Aaron Ciechanover, Avram Hershko e Irwin Rose com um Prêmio Nobel. A degradação acontece no proteossomo 26S, um complexo macromolecular constituído de mais de 30 subunidades polipeptídicas dispostas na forma de um cilindro oco. Os sítios ativos de suas subunidades proteolíticas ficam voltados para o interior do cilindro, evitando, assim, a degradação indiscriminada das proteínas celulares. As proteínas são direcionadas para o interior do proteossomo por "ubiquitinação", a ligação covalente de uma ou mais moléculas de ubiquitina. A ubiquitina é uma proteína pequena, com aproximadamente 75 resíduos, que é altamente conservada entre os eucariotos. A ubiquitinação é catalisada por uma grande família de enzimas chamada ligases E3, que ligam a ubiquitina aos resíduos lisil do grupamento amino da cadeia lateral.

A via ubiquitina-proteossomo é responsável pela degradação regulada de proteínas celulares selecionadas (por exemplo, ciclinas – Capítulo 35) e para a remoção de espécies de proteína defeituosas ou anormais. A chave para a versatilidade e seletividade do sistema ubiquitina-proteossomo reside na variedade de ligases E3 intracelulares e na capacidade delas para discriminar entre os diferentes estados físicos ou conformacionais das proteínas alvo. Desta maneira, a via da ubiquitina-proteossomo pode degradar seletivamente as proteínas cuja integridade física e competência funcional foram comprometidas pela perda ou dano de um grupamento prostético, oxidação de resíduos de cisteína ou histidina, ou desamidação dos resíduos asparagina ou glutamina. O reconhecimento pelas enzimas proteolíticas também pode ser regulado por modificações covalentes como a fosforilação; ligação de substratos ou efetores alostéricos; ou associação a membranas, oligonucleotídeos ou outras proteínas. Crescentes evidências sugerem que as disfunções da via da ubiquitina-proteossomo contribui para o acúmulo de espécies proteicas dobradas de modo anormal, característico de diversas doenças neurodegenerativas.

MÚLTIPLAS OPÇÕES ESTÃO DISPONÍVEIS PARA REGULAR A ATIVIDADE CATALÍTICA

Nos seres humanos, a indução da síntese de proteína é um complexo processo de múltiplas etapas que comumente requer horas para produzir alterações significativas no nível enzimático total. Em contrapartida, as alterações na eficiência catalítica intrínseca efetuada pela ligação de ligantes dissociáveis (**regulação alostérica**) ou por **modificação covalente** alcançam a regulação da atividade enzimática dentro de segundos. Consequentemente, as alterações no nível de proteína em geral dominam quando se deparam com requisitos adaptativos de longo prazo, enquanto as alterações na eficiência catalítica são mais bem adequadas para as alterações rápidas e transitórias no fluxo de metabólito.

OS EFETORES ALOSTÉRICOS REGULAM DETERMINADAS ENZIMAS

A inibição por retroalimentação refere-se ao processo pelo qual o produto final de uma via de biossíntese com múltiplas etapas

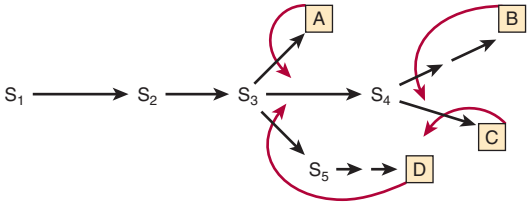


FIGURA 9-4 Sítios de inibição por retroalimentação em uma via de biossíntese ramificada. S_1 a S_5 são intermediários na biossíntese dos produtos finais A-D. As setas retas representam enzimas que catalisam as conversões indicadas. As setas curvas vermelhas representam alças de retroalimentação e indicam os sítios de inibição por retroalimentação por meio de produtos finais específicos.

se liga e inibe uma enzima que catalisa uma das etapas iniciais naquela via. No exemplo a seguir, a biossíntese de D a partir de A catalisada pelas enzimas Enz_1 a Enz_3:

$$A \xrightarrow{Enz_1} B \xrightarrow{Enz_2} C \xrightarrow{Enz_3} D$$

As altas concentrações de D inibem a conversão de A em B. Neste exemplo, o inibidor por retroalimentação D age como um **efetor alostérico negativo** da Enz_1. A inibição resulta, não do acúmulo de intermediários, mas da capacidade de D de se ligar e inibir a Enz_1. De modo geral, D se liga em um **sítio alostérico**, um sítio espacialmente distinto do sítio catalítico da enzima alvo. Dessa forma, os inibidores por retroalimentação comumente comportam pouca ou nenhuma semelhança estrutural com os substratos das enzimas que eles inibem. Por exemplo, o NAD^+ e o 3-fosfoglicerato, os substratos da 3-fosfoglicerato desidrogenase, que catalisam a primeira etapa comprometida na biossíntese da serina, não possuem semelhança com o inibidor por retroalimentação serina. Nas vias de biossíntese ramificadas, como aquelas responsáveis pela biossíntese do nucleotídeo (Capítulo 33), as reações iniciais fornecem os intermediários necessários para a síntese de múltiplos produtos terminais. A **Figura 9-4** mostra uma via de biossíntese ramificada hipotética, na qual as setas curvas conduzem dos inibidores por retroalimentação para as enzimas cujas atividades eles inibem. Das sequências $S_3 \rightarrow A$, $S_4 \rightarrow B$, $S_4 \rightarrow C$ e $S_3 \rightarrow\rightarrow D$, cada uma representa as sequências de reação lineares que são inibidas por retroalimentação por seus produtos finais. As enzimas de pontos de ramificação podem ser assim visadas para direcionar o fluxo metabólico.

Normalmente, os inibidores por retroalimentação inibem a primeira etapa comprometida em uma determinada sequência de biossíntese. A cinética da inibição por retroalimentação pode ser competitiva, não competitiva, parcialmente competitiva ou mista. Múltiplas alças de retroalimentação em camadas podem proporcionar o controle fino. Por exemplo, conforme demonstrado na **Figura 9-5**, a presença de excesso de produto B diminui a necessidade de substrato S_2. Contudo, o S_2 também é necessário para a síntese de A, C e D. Portanto, para esta via, o excesso de B impede a síntese de todos os quatro produtos finais, independente da necessidade dos outros três. Para desviar dessa dificuldade potencial, cada produto final pode inibir apenas parcialmente a atividade catalítica. O efeito de um excesso de dois ou mais produtos finais pode ser estritamente aditivo ou, de modo alternativo, maior que o seus efeitos individuais (inibição por retroalimentação cooperativa).

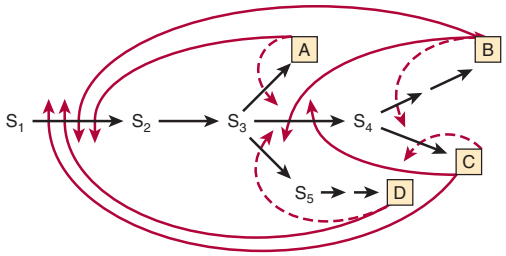


FIGURA 9-5 Múltiplas inibições por retroalimentação em uma via de biossíntese ramificada. Há sobreposição sobre as alças de retroalimentação simples (setas vermelhas tracejadas) de múltiplas alças de retroalimentação (setas vermelhas cheias) que regulam as enzimas comuns à biossíntese de diversos produtos finais.

A aspartato transcarbamoilase é um modelo de enzima alostérica

A aspartato transcarbamoilase (ATCase), o catalisador para a primeira reação exclusiva para a biossíntese da pirimidina (Figura 33-9), é um alvo da regulação por retroalimentação por dois nucleotídeos trifosfatos: citidina trifosfato (CTP) e adenosina trifosfato. A CTP, um produto final da via de biossíntese da pirimidina, inibe a ATCase, enquanto o nucleotídeo purina ATP a ativa. Além disso, os altos níveis de ATP podem superar a inibição pela CTP, possibilitando que a síntese de nucleotídeos *pirimidina* prossiga quando os níveis de nucleotídeos *purina* estão elevados.

Os sítios alostérico e catalítico são espacialmente distintos

Jacques Monod propôs a existência de sítios alostéricos que são fisicamente distintos do sítio catalítico. Ele imaginou que a falta da semelhança estrutural entre um inibidor por retroalimentação e o(s) substrato(s) para a enzima cuja atividade ele regula indicavam que estes efetores não são **isostéricos** com um substrato, mas **alostéricos** ("ocupam o espaço de outro"). Dessa maneira, as **enzimas alostéricas** são aquelas para as quais a catálise no sítio ativo pode ser modulada pela presença de efetores em um sítio alostérico. A existência de sítios alostéricos e ativos espacialmente distintos foi desde então verificada em diversas enzimas pelo uso de muitas linhas de evidência. Por exemplo, a cristalografia por raios X revelou que a ATCase da *E. coli* consiste em seis subunidades catalíticas e seis subunidades reguladoras, as últimas das quais se ligam a nucleotídeos trifosfatos que modulam a atividade. Em geral, a ligação de um regulador alostérico induz uma alteração conformacional na enzima que engloba o sítio ativo.

Os efeitos alostéricos podem ser sobre K_m ou sobre $V_{máx}$

Referir-se à cinética da inibição alostérica como "competitiva" ou "não competitiva" com o substrato comporta implicações mecânicas enganosas. Em vez disso, a referência é feita a duas classes de enzimas alostericamente reguladas: enzimas da série K e da série V. Para as enzimas alostéricas da série K, a cinética de saturação do substrato é competitiva no sentido de que a K_m é elevada sem um efeito sobre a $V_{máx}$. Para as enzimas alostéricas da série V, o inibidor alostérico diminui a $V_{máx}$ sem afetar a K_m. As alterações na K_m ou $V_{máx}$ frequentemente são o produto das alterações conformacionais no sítio catalítico induzidas pela ligação do efetor alostérico em seu sítio. Para uma enzima alostérica da série K, essa alteração conformacional pode enfraquecer as ligações entre o substrato e os resíduos de ligação de substrato. Para uma enzima alostérica da série V, o efeito primário pode ser alterar a orientação ou a carga dos resíduos catalíticos, diminuindo a $V_{máx}$. Os efeitos intermediários sobre a K_m e a $V_{máx}$, no entanto, podem ser observados consequentes a essas alterações conformacionais.

A REGULAÇÃO POR RETROALIMENTAÇÃO NÃO É SINÔNIMO DE INIBIÇÃO POR RETROALIMENTAÇÃO

Tanto nas células de mamíferos quanto nas bactérias, alguns produtos finais controlam suas própria síntese, em muitos casos pela inibição por retroalimentação de uma enzima inicial na biossíntese. Contudo, deve-se diferenciar entre **regulação por retroalimentação**, um termo fenomenológico desprovido de implicações mecânicas, e **inibição por retroalimentação**, um mecanismo para a regulação da atividade da enzima. Por exemplo, enquanto o colesterol na dieta diminui a síntese hepática de colesterol, essa **regulação** por retroalimentação não envolve a **inibição** por retroalimentação. A HMG-CoA redutase, a enzima limitadora da velocidade da colesterogênese, é afetada, mas o colesterol não inibe sua atividade. Em vez disso, a regulação em resposta ao colesterol na dieta envolve o impedimento, pelo colesterol ou por um metabólito do colesterol, da expressão do gene que codifica a HMG-CoA redutase (repressão enzimática) (Capítulo 26).

MUITOS HORMÔNIOS AGEM POR MEIO DE SEGUNDOS MENSAGEIROS ALOSTÉRICOS

Os impulsos nervosos e a ligação de muitos hormônios a receptores de superfície celular provocam alterações na velocidade das reações catalisadas por enzimas dentro das células alvo ao induzir a liberação ou a síntese de efetores alostéricos especializados chamados **mensageiros secundários**. O mensageiro primário, ou "primeiro", é a molécula do hormônio ou impulso nervoso. Os mensageiros secundários incluem o 3′,5′-AMPc, sintetizado a partir do ATP pela enzima adenilil-ciclase em resposta ao hormônio epinefrina, e o Ca^{2+}, que é armazenado dentro do retículo endoplasmático da maioria das células. A despolarização da membrana decorrente de um impulso nervoso abre um canal de membrana que libera os íons cálcio para dentro do citoplasma, onde eles se ligam e ativam enzimas envolvidas na regulação da contração muscular e na mobilização da glicose armazenada a partir do glicogênio. Então, a glicose supre as demandas energéticas aumentadas da contração muscular. Outros mensageiros secundários incluem

o 3′,5′-GMPc, óxido nítrico e os polifosfoinositóis produzidos pela hidrólise de inositol fosfolipídeos por fosfolipases reguladas por hormônio. Os exemplos específicos da participação de mensageiros secundários na regulação de processos celulares podem ser encontrados nos Capítulos 19, 42 e 48.

AS MODIFICAÇÕES COVALENTES REGULADORAS PODEM SER REVERSÍVEIS OU IRREVERSÍVEIS

Nas células de mamíferos, ocorre uma ampla gama de modificações covalentes reguladoras. A **proteólise parcial** e a **fosforilação**, por exemplo, são frequentemente empregadas para regular a atividade catalítica das enzimas. Por outro lado, as histonas e outras proteínas de ligação do DNA na cromatina estão sujeitas à extensa modificação por **acetilação**, **metilação**, **ADP-ribosilação**, bem como fosforilação. As últimas modificações, que modulam a maneira pela qual as proteínas dentro da cromatina interagem entre si, bem como com o próprio DNA, constituem a base para o "código da histona". As alterações resultantes na estrutura da cromatina dentro da região afetada podem tornar os genes mais acessíveis à proteína responsável por sua transcrição, facilitando a replicação de todo o genoma (Capítulo 38). Por outro lado, diz-se que as alterações na estrutura da cromatina que restringem a acessibilidade dos genes aos fatores de transcrição, a RNA-polimerases dependentes do DNA, etc., inibindo, assim, a transcrição, **silenciam** a expressão genética.

O código da histona representa um exemplo clássico da **epigenética**, a transmissão hereditária de informação por meio diferente da sequência de nucleotídeos que compreendem o genoma. Neste caso, o padrão da expressão genética dentro de uma célula-filha recentemente formada será definido, em parte, por um determinado conjunto de modificações covalentes de histona embebidos nas proteínas da cromatina herdadas a partir da célula-mãe.

A acetilação, a ADP-ribosilação, a metilação e a fosforilação são exemplos, sem exceção, de modificações covalentes "reversíveis". Neste caso, reversível se refere ao fato de que a proteína modificada pode ser restaurada a seu estado original sem modificação. Contudo, não se refere aos mecanismos pelos quais essa restauração acontece. A termodinâmica dita que, quando a reação catalisada por enzima pela qual a modificação foi introduzida é favorável do ponto de vista termodinâmico, a alteração da energia livre envolvida em apenas tentar fazer a reação seguir no sentido inverso será desfavorável. A fosforilação de proteínas nos resíduos seril, treonil ou tirosil, catalisada por proteinoquinases, é termodinamicamente favorecida como uma consequência de utilizar o grupamento γ-fosforil de alta energia do ATP. Os grupamentos fosfato são removidos, não por meio de recombinação do fosfato com o ADP para formar ATP, mas por uma reação hidrolítica catalisada por enzimas chamadas de proteínas fosfatases. De forma similar, as acetiltransferases empregam um substrato doador de alta energia, NAD^+, enquanto as deacetilases catalisam uma hidrólise direta que produz acetato livre.

Como a alta barreira entrópica impede a reunificação das duas porções de uma proteína produzidas por hidrólise de uma ligação peptídica, a proteólise constitui uma modificação irreversível do ponto de vista fisiológico. Quando uma pró-proteína é ativada, ela continuará a realizar suas funções catalíticas ou outras funções até que seja removida por degradação ou por algum outro meio. Desta maneira, a ativação do zimogênio representa um mecanismo simples e econômico, embora unidirecional, para restringir a atividade latente de uma proteína até que as circunstâncias apropriadas sejam encontradas. Portanto, não é surpresa que a proteólise parcial seja frequentemente empregada para regular proteínas que atuam no trato gastrintestinal ou na corrente sanguínea em vez de no interior das células.

AS PROTEASES PODEM SER SECRETADAS COMO PRÓ-ENZIMAS CATALITICAMENTE INATIVAS

Determinadas proteínas são sintetizadas e secretadas como precursores proteicos inativos conhecidos como **pró-proteínas**. A proteólise seletiva ou "parcial" converte uma pró-proteína por uma ou mais clivagens proteolíticas sucessivas para uma forma que exibe a característica atividade da proteína madura, por exemplo, sua atividade catalítica. As formas pró-proteína de enzimas são denominadas **pró-enzimas** ou **zimogênios**. As proteínas sintetizadas como pró-proteínas incluem o hormônio insulina (pró-proteína = pró-insulina), as enzimas digestivas pepsina, tripsina e quimotripsina (pró-proteínas = pepsinogênio, tripsinogênio e quimotripsinogênio, respectivamente), diversos fatores da coagulação sanguínea e cascatas de dissolução do coágulo sanguíneo (ver Capítulo 51), e a proteína do tecido conectivo colágeno (pró-proteína = pró-colágeno).

As pró-enzimas facilitam a mobilização rápida de uma atividade em resposta à demanda fisiológica

A síntese e a secreção das proteases como pró-enzimas cataliticamente inativas protegem o tecido de origem (p. ex., o pâncreas) contra a autodigestão, como pode acontecer na pancreatite. Determinados processos fisiológicos, como a digestão, são intermitentes, mas bastante regulares e previsíveis na frequência. Outros, como a formação do coágulo sanguíneo, dissolução do coágulo e reparação tecidual, são feitos "*on line*" apenas em resposta à necessidade fisiológica ou fisiopatológica premente. Os processos de formação e dissolução do coágulo sanguíneo logicamente devem ser coordenados sob o aspecto temporal para alcançar a homeostasia. As enzimas requisitadas de modo intermitente, mas com rapidez, muitas vezes são secretadas em uma forma inicialmente inativa, pois a nova síntese e secreção das proteínas necessárias poderiam ser insuficientes para responder rapidamente a uma demanda fisiopatológica imediata, como a perda sanguínea (ver Capítulo 51).

A ativação da pró-quimotripsina requer a proteólise seletiva

A proteólise seletiva envolve uma ou mais clivagens proteolíticas altamente específicas que podem, ou não, ser acompanha-

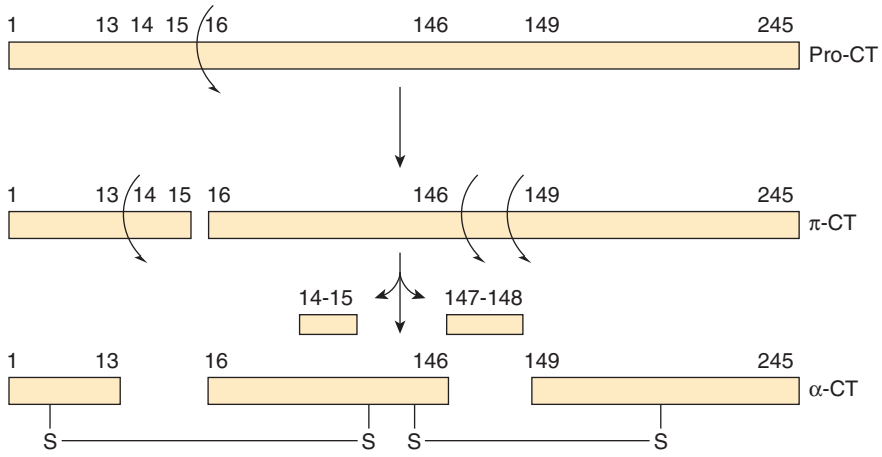


FIGURA 9-6 Representação bidimensional da sequência de eventos proteolíticos que resultam, por fim, na formação do sítio catalítico da quimotripsina, o qual inclui a tríade catalítica Asp102-His57-Ser195 (ver Figura 7-7). A proteólise sucessiva forma pró-quimotripsina (pró-CT), π-quimotripsina (π-Ct) e, por fim, α-quimotripsina (α-CT), uma protease ativa cujos três peptídeos (A, B, C) permanecem associados por pontes dissulfeto covalentes intercadeia.

das pela separação dos peptídeos resultantes. De modo mais importante, a proteólise seletiva geralmente resulta em alterações conformacionais que "criam" o sítio catalítico da enzima. Observe que, embora os resíduos cataliticamente essenciais His 57 e Asp 102 residam no peptídeo B da quimotripsina α, a Ser 195 localiza-se no peptídeo C (**Figura 9-6**). As alterações conformacionais que acompanham a proteólise seletiva da pró-quimotripsina (quimotripsinogênio) alinham os três resíduos da rede de retransmissão de carga (ver Figura 7-7), formando o sítio catalítico. Observe também que o contato e os resíduos catalíticos podem estar localizados em diferentes cadeias peptídicas, mas ainda dentro da distância de formação de ligação do substrato acoplado.

A MODIFICAÇÃO COVALENTE REVERSÍVEL REGULA AS PRINCIPAIS PROTEÍNAS DOS MAMÍFEROS

As proteínas dos mamíferos constituem os alvos de uma ampla gama de processos de modificação covalente. Modificações como a prenilação, glicosilação, hidroxilação e acilação de ácido graxo introduzem aspectos estruturais únicos em proteínas recentemente sintetizadas que tendem a persistir pelo restante da vida da proteína. Dentre as modificações covalentes que regulam a função proteica (p. ex., metilação, acetilação), a mais comum, sem dúvida, é a fosforilação-desfosforilação. As **proteinoquinases** fosforilam as proteínas ao catalisar a transferência do grupamento fosforil terminal do ATP para os grupamentos hidroxila de resíduos seril, treonil ou tirosil, formando resíduos *O*-fosfoseril, *O*-fosfotreonil ou *O*-fosfotirosil, respectivamente (**Figura 9-7**). Algumas proteinoquinases visam às cadeias laterais de resíduos histidil, lisil, arginil e aspartil. A forma não modificada da proteína pode ser regenerada por remoção hidrolítica de grupamentos fosforil, catalisada por **proteína fosfatases.**

Uma típica célula de mamífero possui milhares de proteínas fosforiladas e várias centenas de proteinoquinases e proteínas fosfatases que catalisam suas interconversões. A facilidade da interconversão das enzimas entre suas formas fosfo e desfosfo contribui, em parte, para a frequência com que a fosforilação-desfosforilação é usada como um mecanismo para o controle regulador. A fosforilação-desfosforilação permite que as propriedades funcionais da enzima afetada sejam alteradas apenas enquanto ela serve a uma necessidade específica. Quando a necessidade cessa, a enzima pode ser novamente convertida a sua forma original, pronta para responder ao próximo evento estimulador. Um segundo fator subjacente ao uso disseminado da fosforilação-desfosforilação proteica reside nas propriedades químicas do próprio grupamento fosforil. A fim de alterar as propriedades funcionais de uma enzima, qualquer modificação de sua estrutura química deve influenciar a configuração tridimensional da proteína. A alta densidade de carga dos grupamentos fosforil ligados à proteína – geralmente −2 no pH fisiológico – e suas propensões para formar pontes salinas fortes com os resíduos arginil e lisil os transformam em agentes potentes para mudar a estrutura e a função da proteína. A fosforilação geralmente influencia a eficiência catalítica intrínseca de uma enzima ou outras de suas propriedades ao induzir alterações de

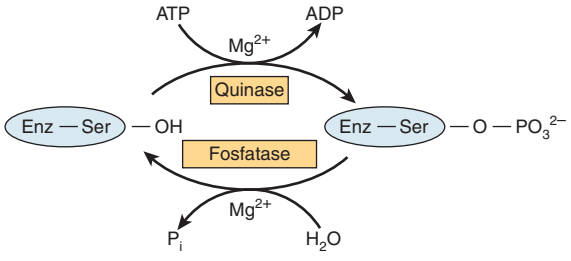


FIGURA 9-7 Modificação covalente de uma enzima necessária para a fosforilação-desfosforilação de um resíduo seril.

conformação. Consequentemente, os aminoácidos atingidos pela fosforilação podem e, em geral, estão relativamente distantes do próprio sítio catalítico.

As modificações covalentes regulam o fluxo de metabólito

Em muitos aspectos, os sítios de fosforilação da proteína e de outras modificações covalentes podem ser considerados como outra forma de sítio alostérico. No entanto, neste caso, o "ligante alostérico" se liga de forma covalente à proteína. Tanto a fosforilação-desfosforilação quanto a inibição por retroalimentação fornecem a regulação prontamente reversível e de curto prazo do fluxo do metabólito em resposta a sinais fisiológicos específicos. Ambas agem sem alterar a expressão gênica. Ambas atuam sobre as enzimas iniciais de uma via metabólica biossintética protraída e ambas agem em sítios alostéricos em lugar de catalíticos. Contudo, a inibição por retroalimentação envolve uma única proteína e carece de aspectos hormonais e neurais. Em contrapartida, a regulação de enzimas de mamíferos por fosforilação-desfosforilação envolve diversas proteínas e ATP, além de estar sob controle neural e hormonal direto.

A FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA É EXTREMAMENTE VERSÁTIL

A fosforilação-desfosforilação proteica é um processo altamente versátil e seletivo. Nem todas as proteínas estão sujeitas à fosforilação e, dentre os muitos grupamentos hidroxila na superfície de uma proteína, apenas um ou um pequeno subgrupo é visado. Embora a função enzimática mais comumente afetada seja a eficiência catalítica da proteína, a fosforilação também pode alterar sua localização dentro da célula, a suscetibilidade à degradação proteolítica ou a responsividade à regulação por ligantes alostéricos. A fosforilação pode aumentar a eficiência catalítica de uma enzima, convertendo-a em sua forma ativa em uma proteína, enquanto a fosforilação de outra proteína a converte em uma forma intrinsecamente ineficaz ou inativa (**Tabela 9-1**).

Muitas proteínas podem ser fosforiladas em múltiplos sítios. Outras estão sujeitas à regulação por fosforilação-desfosforilação e por ligação de ligantes alostéricos, ou por fosforilação-desfosforilação e outra modificação covalente. A fosforilacão-desfosforilação em um sítio qualquer pode ser catalisada por múltiplas proteinoquinases ou proteína fosfatases. Muitas proteinoquinases e a maioria das proteínas fosfatases atuam sobre mais de uma proteína, e são interconvertidas entre as formas ativas e inativas pela ligação de mensageiros secundários ou por modificação covalente por intermédio da fosforilação-desfosforilação.

A interrelação entre as proteinoquinases e proteínas fosfatases, entre as consequências funcionais da fosforilação em diferentes sítios, entre sítios de fosforilação e sítios alostéricos ou entre sítios de fosforilação e outros sítios de modificação covalente proporciona a base para as redes reguladoras que integram os múltiplos sinais afluentes ambientais para gerar uma resposta celular coordenada apropriada. Nessas sofisticadas redes reguladoras, as enzimas individuais respondem a diferentes sinais ambientais. Por exemplo, quando uma enzima pode ser fosforilada em um único sítio por mais de uma proteinoquinase, ela pode ser convertida de uma forma cataliticamente eficiente para uma forma ineficaz (inativa) ou vice-versa. Quando a proteinoquinase é ativada em resposta a um sinal diferente do qual ativa a proteína fosfatase, a fosfoproteína se torna um nodo de decisão. O débito funcional, geralmente a atividade catalítica, reflete o estado de fosforilação. Esse estado ou grau de fosforilação é determinado pelas atividades relativas da proteinoquinase e proteína fosfatase, um reflexo da presença e força relativa dos sinais ambientais que agem por meio de cada uma.

TABELA 9-1 Exemplos de enzimas de mamíferos cuja atividade catalítica é alterada por fosforilação-desfosforilação covalente

	Estado de atividade	
Enzima	**Baixo**	**Alto**
Acetil-CoA carboxilase	EP	E
Glicogênio sintetase	EP	E
Piruvato-desidrogenase	EP	E
HMG-CoA redutase	EP	E
Glicogênio fosforilase	E	EP
Citrato liase	E	EP
Fosforilase quinase b	E	EP
HMG-CoA redutase quinase	E	EP

Abreviaturas: E, desfosfoenzima; EP, fosfoenzima.

A capacidade de muitas proteinoquinases e proteínas fosfatases de visar mais de uma proteína propicia um meio para que um sinal ambiental regule de forma coordenada múltiplos processos metabólicos. Por exemplo, as enzimas 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase e acetil-CoA carboxilase – as enzimas controladoras da velocidade para a biossíntese de colesterol e ácidos graxos, respectivamente – são fosforiladas e inativadas pela proteinoquinase ativada por AMP. Quando essa proteinoquinase é ativada pela fosforilação por outra proteinoquinase ou em resposta a seu ativador alostérico 5′-AMP, as duas vias principais responsáveis pela síntese de lipídeos a partir de acetil-CoA são, ambas, inibidas.

OS EVENTOS REGULADORES INDIVIDUAIS SE COMBINAM PARA FORMAR SOFISTICADAS REDES DE CONTROLE

As células realizam um complexo arranjo de processos metabólicos que devem ser regulados em resposta a um amplo espectro de fatores ambientais. Portanto, as enzimas interconversíveis e as enzimas responsáveis pela interconversão delas

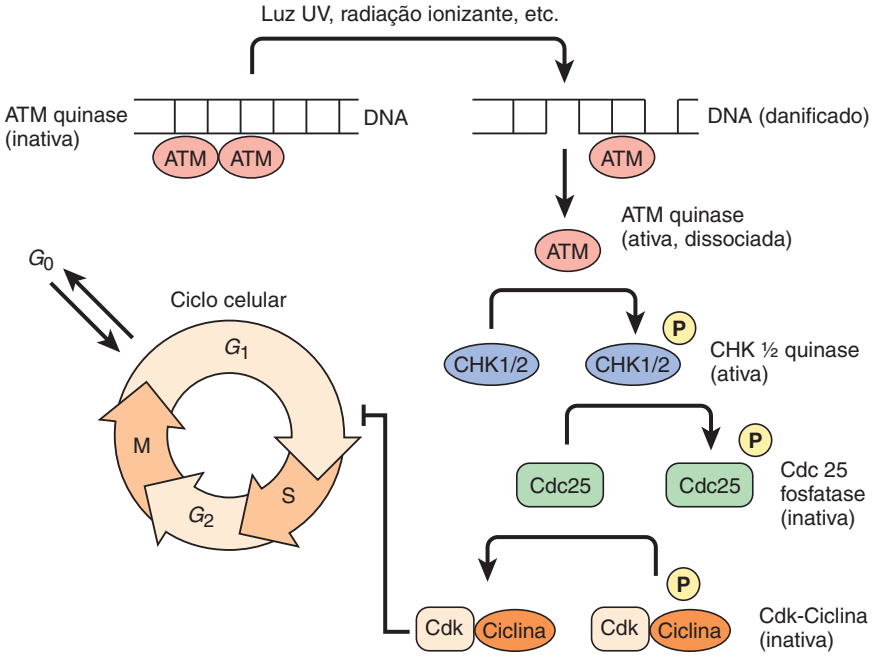


FIGURA 9-8 Uma representação simplificada do ponto de verificação G_1 para S do ciclo da célula eucariótica. O círculo mostra os diversos estágios no ciclo da célula eucariótica. O genoma é replicado durante a fase S, enquanto duas cópias do genoma são segregadas e ocorre a divisão celular durante a fase M. Cada uma destas fases é separada por uma fase *G*, ou de crescimento, caracterizada por um aumento no tamanho da célula e pelo acúmulo de precursores necessários para a montagem dos grandes complexos macromoleculares formados durante as fases S e M.

não agem como comutadores "ligados" e "desligados" isolados. A fim de satisfazer às demandas da manutenção da homeostasia, esses blocos de construção são ligados para formar redes reguladoras integradas.

Um exemplo bem estudado de uma dessas redes é o ciclo da célula eucariótica que controla a divisão celular. Após a saída do estado G_0 ou quiescente, o processo extremamente complexo da divisão celular prossegue por uma série de fases específicas designadas G_1, *S*, G_2 e *M* (**Figura 9-8**). Elaborados sistemas de monitoração, chamados pontos de verificação, avaliam os principais indicadores da progressão para garantir que nenhuma fase do ciclo seja iniciada até que a fase anterior se complete. A Figura 9-8 delineia, de forma simplificada, parte do ponto de verificação que controla o início da replicação do DNA, chamado de fase S. Uma proteinoquinase denominada ATM está associada ao genoma. Se o DNA contém uma ruptura no filamento duplo, a alteração resultante na conformação da cromatina ativa a ATM. Após a ativação, uma subunidade do dímero de ATM ativado se dissocia e inicia uma série ou cascata de eventos de fosforilação-desfosforilação da proteína mediada pelas proteínas quinases CHK1 e CHK 2, pela proteína fosfatase Cdc25 e, por fim, por um complexo entre uma ciclina e uma proteína quinase dependente de ciclina, ou Cdk. A ativação do complexo Cdk-ciclina bloqueia a transição de G_1 para S, impedindo assim a replicação do DNA danificado. A falha neste ponto de verificação pode levar a mutações no DNA que podem conduzir ao câncer ou a outras doenças. Cada etapa na cascata propicia uma via para monitorar indicadores adicionais do estado celular antes de entrar na fase S.

RESUMO

- A homeostasia envolve a preservação de um ambiente intracelular e intraórgão relativamente constante, apesar das amplas flutuações no ambiente externo. Isso é alcançado por meio das alterações apropriadas nas velocidades das reações bioquímicas em resposta à necessidade fisiológica.
- Os substratos para a maioria das enzimas geralmente está presente em uma concentração próxima a sua K_m. Isso facilita o controle passivo das velocidades de formação do produto em resposta às alterações nos níveis dos intermediários metabólicos.
- O controle ativo do fluxo de metabólito envolve alterações na concentração, atividade catalítica, ou em ambas, da enzima que catalisa uma reação de limitada de velocidade comprometida.
- A proteólise seletiva de pró-enzimas inicia as alterações conformacionais que formam o sítio ativo. A secreção como uma pró-enzima inativa facilita a rápida mobilização da atividade em resposta à lesão ou necessidade fisiológica e pode proteger o tecido de origem (p. ex., autodigestão por proteases).
- A ligação de metabólitos e mensageiros secundários a sítios distintos do sítio catalítico das enzimas deflagra alterações conformacionais que mudam a $V_{máx}$ ou a K_m.
- A fosforilação por proteinoquinases de resíduos seril, treonil ou tirosil específicos – e a subsequente desfosforilação pelas proteínas fosfatases – regula a atividade de muitas enzimas humanas. As proteinoquinases e fosfatases que participam nas cascatas reguladoras que respondem a sinais hormonais ou de

mensageiros secundários constituem redes reguladoras que podem processar e integrar informações ambientais complexas para produzir uma resposta celular apropriada e abrangente.

REFERÊNCIAS

Ciechanover A, Schwartz AL: The ubiquitin system: pathogenesis of human diseases and drug targeting. Biochim Biophys Acta 2004;1695:3.

Elgin SC, Reuter G. In Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D, et al (editors): Epigenetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007.

Johnson LN, Lewis RJ: Structural basis for control by phosphorylation. Chem Rev 2001;101:2209.

Muoio DM, Newgard CB: Obseity-related derangements in metabolic regulation. Anu Rev Biochem 2006;75:403.

Scriver CR, Sly WS, Childs B, et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 8th ed. McGraw-Hill, 2000.

Stieglitz K, Stec B, Baker DP, et al: Monitoring the transition from the T to the R state in *E. coli* aspartate transcarbamoylase by x-ray crystallography: crystal structures of the E50A mutant enzyme in four distinct allosteric states. J Mol Biol 2004; 341:853.

Tu BP, Kudlicki A, Rowicka M, et al: Logic of the yeast metabolic cycle: temporal compartmentalization of cellular processes. Science 2005;310:1152.

Walsh CT: *Posttranslational Modification of Proteins. Expanding Nature's Inventory,* Roberts and Company Publishers, 2006.

CAPÍTULO

10

Bioinformática e Biologia Computacional

Peter J. Kennely, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever os principais aspectos da genômica, proteômica e bioinformática.
- Resumir os principais aspectos e a relevância clínica do projeto Encode.
- Caracterizar as funções realizadas pelas bases de dados HapMap, *Entrez* Gene, BLAST e dbGAP.
- Relatar os principais aspectos da idealização e descoberta de medicamento auxiliada por computador.
- Expor as possíveis aplicações futuras de modelos computacionais de vias metabólicas individuais e redes de vias metabólicas.
- Delinear a possível utilidade médica das "células virtuais".

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Os primeiros modelos científicos da patogenia, como a teoria de Louis Pasteur sobre germes seminais como agentes de doença, eram de natureza binária: cada doença tinha um agente etiológico único e definível. A malária era causada pela ameba *Plasmodium falciparum*; a tuberculose, pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*; a doença falciforme, por mutação no gene que codifica uma das subunidades da hemoglobina; a poliomielite, pelo poliovírus e o escorbuto por deficiência no ácido ascórbico. A estratégia para tratar ou evitar a doença poderia, assim, ser reduzida a um processo direto de rastrear o agente etiológico e, em seguida, idealizar algum meio de eliminá-lo, neutralizar seus efeitos ou bloquear sua via de transmissão. Essa conduta foi empregada com sucesso para compreender e tratar uma ampla gama de doenças infecciosas e genéticas. Contudo, ficou claro que os determinantes de muitas patologias – inclusive câncer, cardiopatia coronária, diabetes tipo 2 e doença de Alzheimer – são de natureza **multifatorial**. Em vez de ter um agente etiológico específico ou agentes cuja presença é necessária e suficiente, o aparecimento e a progressão das doenças acima mencionadas refletem a complexa interrelação da constituição genética de cada indivíduo, outros fatores **epigenéticos** ou herdados e os fatores ambientais como a dieta, o estilo de vida, as toxinas, os vírus ou as bactérias.

O desafio imposto pelas **doenças multifatoriais** exige um *quantum* de aumento na amplitude e profundidade de nosso conhecimento dos organismos vivos capaz de satisfazer às suas sofisticações e complexidades. Devem ser identificadas as muitas proteínas ainda desconhecidas codificadas dentro dos genomas dos seres humanos e os organismos com os quais elas interagem, suas funções e interações celulares. Deve existir a capacidade humana de rastrear os fatores, tanto externos quanto internos, que comprometem a saúde e o bem-estar dos seres humanos ao analisar o impacto dos fatores nutricionais, genéticos e ambientais por meio de todas as comunidades ou populações. A totalidade da massa de informações que deve ser processada fica bem além da capacidade da mente humana para ser revista e analisada sem auxílio. Para compreender, da maneira mais completa e abrangente possível, os mecanismos moleculares que fundamentam o comportamento dos organismos vivos, a maneira pela qual as perturbações podem conduzir à doença ou disfunção, e como esses fatores perturbadores se disseminam por toda uma população, os cientistas biomédicos se voltaram para instrumentos computadorizados sofisticados para coletar e avaliar as informações biológicas em escala de massa.

GENÔMICA: AVALANCHE DE INFORMAÇÕES

Os médicos e os cientistas há muito compreenderam que o genoma, o conjunto completo de informações genéticas de um organismo vivo, representava uma rica fonte de informações

relacionadas com temas que variam desde o metabolismo básico, passando pela evolução até o envelhecimento. Contudo, o imenso tamanho do genoma humano, 3×10^9 pares de bases de nucleotídeos, exigiu uma mudança de paradigma na maneira pela qual os cientistas abordavam a determinação das sequênciais de DNA. Recentes avanços na bioinformática e na biologia computacional foram incentivados, por sua vez, pela necessidade de desenvolver novas condutas para extrair a massa de dados sequenciais gerada pela aplicação da tecnologia progressivamente mais eficiente e econômica aos genomas de centenas de novos organismos e, mais recentemente, de diversos seres humanos individuais.

O Projeto Genoma Humano

O término bem-sucedido do Projeto Genoma Humano (HGP) representa o ápice de mais de seis décadas de realizações nas biologias molecular, genética e bioquímica. A cronologia adiante lista vários dos eventos marcantes que levaram à determinação da totalidade da sequência do genoma humano.

1944 – Demonstra-se que o DNA é o material hereditário
1953 – É firmado o conceito da dupla-hélice
1966 – Soluciona-se o código genético
1972 – É desenvolvida a tecnologia do DNA recombinante
1977 – Surge a tecnologia de sequenciamento prático do DNA
1983 – É mapeado o gene para a doença de Huntington
1985 – É inventada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)
1986 – O sequenciamento do DNA se torna automatizado
1986 – O gene da distrofia muscular de Duchenne é identificado
1989 – É identificado o gene da fibrose cística
1990 – O Projeto Genoma Humano é lançado nos Estados Unidos
1994 – Termina o mapeamento genético humano
1996 – É estabelecido o primeiro mapa genético humano
1999 – É iniciada a *Single Nucleotide Polymorphism Initiative*
1999 – É completada a primeira sequência de um cromossoma humano, número 22
2000 – É completado o "primeiro esboço" do genoma humano
2003 – O sequenciamento do primeiro genoma humano é completado
2010 – Os cientistas iniciam o sequenciamento de 1.000 genomas individuais para determinar o grau de diversidade genética nos seres humanos

Em 2011, mais de 180 genomas eucarióticos, procarióticos e arcaicos tinham sido sequenciados. Os exemplos incluem os genomas de galinha, gato, cachorro, elefante, rato, coelho, orangotango, mamute peludo e ornitorrinco, além dos genomas de vários indivíduos como Craig Venter e James Watson. O ano de 2010 presenciou o término do genoma do homem de Neanderthal, cuja análise inicial sugere que até 2% do DNA no genoma dos seres humanos atuais fora da África surgiu em ancestrais do Neanderthal ou no Neanderthal.

No momento em que foi escrito este capítulo, foram relatadas as sequências de genoma de mais de 5.000 entidades biológicas, variando desde vírus e bactérias a vegetais e animais. O pronto acesso às sequências do genoma a partir de organismos abrangendo todos os três domínios filogenéticos e a necessidade de algoritmos poderosos para manipular e transformar os dados obtidos dessas sequências modificaram a pesquisa básica em biologia, microbiologia, farmacologia e bioquímica.

Genomas e a medicina

Ao comparar os genomas de cepas patogênicas e não patogênicas de um determinado microrganismo, os genes prováveis de codificar os determinantes da virulência podem ser destacados em virtude de sua presença apenas na cepa virulenta. De maneira similar, a comparação dos genomas de um patógeno com seu hospedeiro pode identificar os genes próprios do primeiro. Os medicamentos que se direcionam para os produtos proteicos de genes patógeno-específicos devem, na teoria, produzir pouco ou nenhum efeito para o hospedeiro infectado. A próxima década testemunhará a expansão da "Revolução da Genômica" na prática cotidiana da medicina e agricultura, à medida que os médicos e cientistas possam explorar o novo conhecimento do genoma humano e dos genomas dos organismos que colonizam, se alimentam e infectam o *Homo sapiens*. Embora o primeiro projeto do genoma humano tenha exigido vários anos, centenas de pessoas e muitos milhões de dólares para ser terminado, o *quantum* de avanço na eficácia e economia levou uma empresa a projetar que até um milhão de indivíduos terão suas sequências de genoma individuais determinadas por volta do ano de 2014. A capacidade de diagnosticar e tratar os pacientes orientada pelo conhecimento de suas constituições genéticas, uma conduta popularmente conhecida como "medicina personalizada", tornará os medicamentos mais seguros e mais efetivos.

Sequenciamento do exoma

Um prenúncio desta nova era foi fornecido pela aplicação do "sequenciamento do exoma" ao diagnóstico de doenças genéticas raras ou ambíguas. O exoma consiste naqueles segmentos de DNA, chamados éxons, que codificam as sequências de aminoácidos das proteínas (Capítulo 36). Como os éxons compreendem apenas aproximadamente 1% do genoma humano, o exoma representa um alvo muito menor e mais tratável que o genoma completo. A comparação de sequências de exoma identificou os genes responsáveis por uma lista crescente de patologias, a qual inclui a retinite pigmentosa, a síndrome de Freeman-Sheldon e a síndrome de Kabuki.

Os desafios potenciais da medicina personalizada

Embora a "medicina personalizada" com base no genoma prometa ser muito efetiva, ela também confronta a humanidade com imensos desafios nas áreas da ética, do direito e de políticas públicas. Quem tem e controla o acesso a essas informações? Por exemplo, uma empresa de seguro de vida ou de seguro-saúde pode negar a cobertura para um indivíduo com base nos fatores de riscos evidenciados a partir de sua sequência de genoma? Um futuro empregador tem o direito de conhecer a constituição genética de um empregado em potencial? Os futuros cônjuges têm

o direito de saber os fatores de risco genéticos de suas noivas ou noivos? Ironicamente, a resolução desses problemas pode vir a ser um processo mais demorado e trabalhoso que a determinação da primeira sequência do genoma humano.

BIOINFORMÁTICA

A **bioinformática** explora o armazenamento de imensas informações e as capacidades de processamento do computador para desenvolver instrumentos para a coleta, colagem, recuperação e análise de dados biológicos em uma escala de massa. Esses muitos recursos de bioinformática (ver a seguir) passíveis de ser acessados por meio da *internet* propiciam a eles um impacto e alcance global. O objetivo central de um projeto de bioinformática típico consiste em reunir todas as informações disponíveis pertinentes a um determinado tema em uma única localização, frequentemente chamada de **biblioteca** ou **base de dados**, em formato uniforme, o que torna os dados passíveis à manipulação e análise por algoritmos computadorizados.

Bases de dados de bioinformática

O tamanho e as capacidades das bases de dados de bioinformática podem variar muito, dependendo do espectro e da natureza de seus objetivos. A base de dados PubMed *(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed)* compila as citações para todos os artigos publicados em milhares de periódicos devotados à pesquisa biomédica e biológica. Atualmente, o PubMed contém mais de 20 milhões de citações. Em contrapartida, a RNA Helicase Database *(http://www.rnahelicase.org/)* se restringe à sequência, à estrutura e às funções bioquímica e celular de uma única família de enzimas, as RNA-helicases.

Desafios da construção da base de dados

A construção de uma base de dados abrangente e utilizável comporta muitos desafios. Em primeiro lugar, a informação biomédica existe em uma ampla variedade de formas. Por exemplo, a informação de codificação em um genoma, embora volumosa, é composta por sequências lineares simples de quatro bases de nucleotídeos. Embora o número de resíduos de aminoácidos que define a estrutura primária de uma proteína seja pequeno em relação ao número de pares de bases em um genoma, uma descrição da estrutura radiográfica de uma proteína requer que a localização de cada átomo seja especificada no espaço tridimensional.

Em segundo lugar, o idealizador deve antecipar corretamente a maneira pela qual os usuários podem querer pesquisar ou analisar as informações dentro de uma base de dados, bem como idealizar os algoritmos para lidar com essas variáveis. Até mesmo a tarefa aparentemente simples de procurar uma base de dados de genes emprega, em geral, de modo isolado ou em várias combinações, critérios tão diversificados quanto o nome do gene, o nome da proteína que ele codifica, a função biológica do produto genético, uma sequência nucleotídica dentro do gene, uma sequência de aminoácidos dentro da proteína que ela codifica, o organismo em que está presente ou o nome dos pesquisadores que determinaram a sequência daquele gene.

A EPIDEMIOLOGIA ESTABELECEU O POTENCIAL MÉDICO DO PROCESSAMENTO DE INFORMAÇÕES

O poder da pesquisa biomédica básica reside na capacidade do cientista de laboratório de manipular alvos de pesquisa bem definidos e homogêneos sob circunstâncias cuidadosamente controladas. A capacidade de variar de modo independente as características qualitativas e quantitativas tanto do alvo quanto das variáveis de entrada permite que se determinem as relações de causa e efeito de forma direta e confiável. Contudo, essas vantagens são obtidas ao se empregar organismos-modelos, como o camundongo ou linhagens de células humanas cultivadas como próprias para pacientes humanos que representam os alvos finais e beneficiários desta pesquisa. As cobaias nem sempre reagem como o *Homo sapiens*, nem uma placa de fibroblastos, de células renais ou de outras células cultivadas consegue replicar a incrível complexidade de um ser humano.

Embora incapaz de empreender experimentos rigorosamente controlados em seres humanos, a observação rigorosa do comportamento mundial real mostrou, há muito, ser uma fonte de importantes avanços biomédicos. Por exemplo, Hipócrates observou que, embora determinadas doenças **epidêmicas** aparecessem de maneira esporádica, as doenças **endêmicas**, como a malária, exibiam clara associação com determinados locais, grupos etários, etc. A **epidemiologia** refere-se ao ramo das ciências biomédicas que emprega condutas de bioinformática para estender nossa capacidade e aumentar a exatidão com a qual se pode identificar fatores contribuintes ou depreciadores da saúde humana por meio do estudo das populações mundiais reais.

Epidemiologia inicial da cólera

Um dos primeiros estudos epidemiológicos, realizado pelo Dr. John Snow, empregou a análise geoespacial simples para rastrear a origem de um surto de cólera. Epidemias de cólera, tifo e outras doenças infecciosas eram relativamente comuns nas condições insalubres da Londres do século XIX. Ao mapear as localizações das residências das vítimas, Snow foi capaz de rastrear a origem do contágio até a contaminação de uma das fontes públicas que supriam os cidadãos com sua água potável (**Figura 10-1**). Infelizmente, a capacidade limitada dos cálculos ou gráficos manuais tornou o sucesso de análises como a de Snow criticamente dependente da escolha da hipótese de trabalho utilizada para selecionar as variáveis a serem medidas e processadas. Assim, embora os londrinos do século XIX também reconhecessem amplamente que os chapeleiros estavam particularmente propensos a exibir um comportamento errático e irracional (p. ex., "tão louco quanto um chapeleiro"), quase um século transcorreu até que a etiologia fosse rastreada até os compostos mercuriais usados para preparar o feltro com o qual se fabricava os chapéus.

Impacto da bioinformática sobre a análise epidemiológica

À medida que o processo de análise de dados se tornou automatizado, a sofisticação e a taxa de sucesso das análises epidemiológicas subiram na mesma proporção. Hoje, os complexos

FIGURA 10-1 Esta versão do mapa desenhada pelo Dr. John Snow compara a localização (pontos) das residências das vítimas de uma epidemia de cólera em Londres em 1854 com a localização (X) das bombas que forneciam sua água potável. A água contaminada a partir de uma bomba em Broad Street, situada aproximadamente no centro do aglomerado de vítimas, mostrou ser a origem da epidemia nestas vizinhanças.

algoritmos computadorizados possibilitam que os pesquisadores avaliem a influência de uma ampla gama de parâmetros relacionados com a saúde quando rastreiam a identidade e a origem ou reconstrõem a transmissão de uma doença ou patologia: altura, peso, raça, sexo, índice de massa corporal, dieta, etnicidade, história patológica, profissão, uso de drogas, álcool ou fumo, exercício, pressão arterial, habitat, estado civil, tipo sanguíneo, nível de colesterol sérico, etc. Igualmente importante, a bioinformática moderna pode brevemente capacitar os epidemiologistas a dissecar as identidades e as interações de múltiplos fatores subjacentes a doenças complexas, como o câncer ou a doença de Alzheimer.

O acúmulo de sequências genômicas individuais logo irá introduzir uma nova dimensão poderosa à gama de fatores biológicos, ambientais e comportamentais a serem comparados e contrastados com a história médica de cada pessoa. Um dos primeiros frutos desses estudos foi a identificação dos genes responsáveis por alguns dos mais de 3.000 distúrbios mendelianos conhecidos ou suspeitados, cujas anormalidades genéticas etiológicas ainda precisam ser delineadas. A capacidade de avaliar as contribuições e as interações entre a constituição genética, o comportamento, o ambiente, a dieta e o estilo de vida de uma pessoa detêm a promessa de revelar mais adiante as respostas para a antiga pergunta de por que algumas pessoas exibem maior vitalidade, vigor, longevidade e resistência à doença que outras – em outras palavras, as origens fundamentais da saúde e bem-estar.

BIOINFORMÁTICA E RECURSOS GENÉTICOS

A grande coleção de bases de dados que foi desenvolvida para a montagem, anotação, análise e distribuição de dados biológicos e biomédicos reflete a amplitude e a variedade das pesquisas molecular, bioquímica, epidemiológica e clínica contemporâneas. Abaixo estão listados exemplos dos seguintes recursos de bioinformática eminentes: UniProt, GenBank e o ProteinDatabase (PDB) representam três das bases de dados mais antigas e mais amplamente utilizadas na bioinformática. Cada uma complementa a outra ao focalizar um aspecto diferente da estrutura macromolecular.

Uniprot

O UniProt Knowledgebase (http://www.pir.uniprot.org/) pode rastrear suas origens até o *Atlas of Protein Sequence and Structure*, enciclopédia impressa sobre as sequências de proteína publicada pela primeira vez em 1968 por Margaret Dayhoff e a National Biomedical Research Foundation na Georgetown University. O objetivo do Atlas era facilitar estudos da evolução da proteína usando as sequências de aminoácidos geradas em consequência do desenvolvimento do método Edman para o sequenciamento proteico (Capítulo 4). Na parceria com o Martinsreid Institute for Protein Sequences e com a International Protein Information Database of Japan, o Atlas fez a transição para a forma eletrônica como a Protein Information Resource (PIR) Protein Sequence Database em 1984. Em 2002, a PIR integrou sua base de dados da sequência e função da proteína com o Swiss-Prot Protein Database estabelecida por Amos Bairoch em 1986 sob os auspícios do Swiss Institute of Bioinformatics e o European Bioinformatics Institute, para formar o recurso mais abrangente do mundo sobre a estrutura e função da proteína, o Uni Prot Knowledgebase.

GenBank

A meta do GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), a base de dados de sequência genética do National Institutes of Health (NIH), consiste em coletar e armazenar todas as sequências de nucleotídeos biológicos conhecidas e suas traduções em forma pesquisável. Estabelecida em 1979 por Walter Goad do Los Alamos National Laboratory, o GenBank é atualmente mantido pelo National Center for Biotechnology Information no NIH. O GenBank constitui um dos marcos da International Sequence Database Collaboration, um consórcio que inclui o DNA Database of Japan e o European Molecular Biology Laboratory.

PDB

O RCSB Protein Data Base (PDB) (http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do), um repositório de estruturas tridimensionais de proteínas, polinucleotídeos e outras macromoléculas biológicas foi estabelecido em 1971 por Edgar Meyer e Walter Hamilton do Brookhaven National Laboratories. Em 1998, a responsabilidade pelo PDB foi transferida para o Research Collaboration for Structural Bioinformatics formado pela Universidade de Rutgers, Universidade da Califórnia em San Diego, e a Universidade de Wisconsin. O PDB contém bem mais de 50.000 estruturas tridimensionais para proteínas, bem como proteínas ligadas a substratos, análogos de substrato, inibidores ou outras proteínas. O usuário pode rodar livremente estas estruturas no espaço tridimensional, destacar aminoácidos específicos e selecionar a partir de vários formatos, como enchimento de espaço, fita, coluna central, etc. (Capítulos 5, 6 e 10).

SNPs E SNPs marcados

Embora as sequências do genoma de dois indivíduos quaisquer sejam 99,9% idênticas, o DNA humano contém aproximadamente 10 milhões de sítios onde os indivíduos diferem em uma única base nucleotídica. Esses sítios são chamados de **polimorfismos de nucleotídeo único ou SNPs**. Quando conjuntos de SNPs localizados no mesmo cromossomo são herdados juntos em blocos, o padrão dos SNPs em cada bloco é denominado um **haplótipo**. Ao comparar as distribuições de haplótipo entre grupos de indivíduos que diferem em alguma característica fisiológica, como a sensibilidade a uma doença, os cientistas biomédicos podem identificar SNPs que estão associados a traços fenotípicos específicos. Esse processo pode ser facilitado ao se focalizar nos **SNPs marcados**, um subgrupo de SNPs em determinado bloco suficiente para fornecer um marcador único para determinado haplótipo. O estudo detalhado de cada região deve revelar variantes nos genes que contribuem para uma doença ou resposta específica.

HapMap

Em 2002, cientistas dos Estados Unidos, do Canadá, da China, do Japão, da Nigéria e do Reino Unido lançaram o Projeto International **Haplotype Map** (**HapMap**) (http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/), abrangente esforço para identificar SNPs associados a doenças humanas comuns e a respostas diferenciais para farmacêuticos. O **Hap Map Database** resultante deve levar ao diagnóstico, à prevenção aumentada e ao tratamento do paciente mais exatos e precoces. O conhecimento do perfil genético de um indivíduo também será utilizado para orientar a seleção de vacinas ou medicamentos mais seguros e efetivos, um processo denominado **farmacogenômica**. Esses marcadores genéticos também fornecerão rótulos com os quais se identificam e rastreiam genes específicos, à medida que os cientistas procuram aprender mais sobre os processos críticos da herança e seleção genética.

ENCODE

A identificação de todos os *elementos funcionais* do genoma expandirá muito nossa compreensão dos eventos moleculares que fundamentam o desenvolvimento humano, a saúde e a doença. Para abordar essa meta, no final de 2003, o National Human Genome Research Institute (NHGRI) iniciou o **Projeto ENCODE** (**Encyclopedia of DNA Elements**). Com base na Universidade da Califórnia em Santa Cruz, o ENCODE (http://www.genome.gov/10005107) é um esforço colaborativo que combina condutas laboratoriais e computadorizadas para identificar todo elemento funcional no genoma humano. Os pesquisadores do consórcio com bases e conhecimentos diversificados colaboram no desenvolvimento e na avaliação de novas técnicas de alto débito, tecnologias e estratégias para abordar as atuais deficiências em nossa capacidde de identificar os elementos funcionais.

A fase piloto do ENCODE visou ~1% (30 Mb) do genoma humano para a rigorosa análise experimental e computacional. Diversos métodos foram empregados para identificar, ou **anotar**, a função de cada porção do DNA em etapas de 500 pares de base. Tais estudos pilotos revelaram que o genoma humano contém um grande número e uma variedade de componentes funcionalmente ativos entrelaçados para formar redes complexas. A busca bem-sucedida desse estudo piloto resultou no custeio de uma série de Projetos de Escaladas voltados para decifrar os 99% restantes do genoma.

Entrez Gene

A ***Entrez* Gene** (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene), base de dados mantida pelo National Center for Biote-

chnology Information (NCBI), fornece uma variedade de informações sobre genes humanos individuais. A informação inclui a sequência do genoma no gene e a seu redor, os limites de éxon-íntron, a sequência do(s) mRNA(s) produzida a partir do gene e quaisquer fenótipos conhecidos associados a uma determinada mutação do gene em questão. O *Entrez* Gene também lista, quando conhecida, a função da proteína codificada e o impacto dos polimorfismos de nucleotídeo único conhecidos dentro de sua região de codificação.

dbGAP

A **dbGAP**, a **Database of Genotype and Phenotype**, é uma base de dados da NCBI que complementa o *Entrez* Gene (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gap). A dbGAP compila os resultados de pesquisa nos *links* entre genótipos e fenótipos específicos. Para proteger a confidencialidade de dados clínicos sensíveis, as informações contidas no dbGAP são organizadas em seções de acesso aberto e restrito. O acesso aos dados sensíveis exige que o usuário se submeta à autorização de um comitê de acesso de dados.

Bases de dados adicionais

Outras bases de dados que lidam com a genética humana e a saúde incluem a **OMIM**, Online Mendelian Inheritance in Man (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim), a **HGMD**, a Human Gene Mutation Database (http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php), a **Cancer Genome Atlas** (http://cancergenome.nih.gov/) e a **Gene Cards** (http://www.genecards.org/), que tenta coletar todas as informações relevantes sobre um determinado gene a partir das bases de dados por todo o mundo, de modo a criar um único "cartão" abrangente para cada gene.

BIOLOGIA COMPUTACIONAL

O principal objetivo da **biologia computacional** consiste em desenvolver modelos de computador que apliquem os princípios físicos, químicos e biológicos para reproduzir o comportamento das moléculas e processos biológicos. Diferente da bioinformática, cujo foco principal reside na coleta e avaliação dos dados existentes, a biologia computacional é experimental e de natureza exploradora. Ao realizar experiências e análises virtuais "*in silico*", o que significa ser realizada em computador ou por simulação em computador, a biologia computacional oferece a promessa de acelerar muito a velocidade e a eficiência da descoberta científica.

Os biólogos computacionais estão tentando desenvolver modelos preditivos que (1) possibilitarão que a estrutura tridimensional de uma proteína seja determinada diretamente a partir de sua sequência primária, (2) determinarão a função de proteínas desconhecidas a partir de suas sequências e estruturas, (3) farão triagem para potenciais inibidores de uma proteína *in silico* e (4) construirão células virtuais que reproduzem o comportamento e predizem as respostas de suas correspondentes vivas aos patógenos, toxinas, dieta e medicamentos. A criação de algoritmos computadorizados que imitam com exatidão o comportamento das proteínas, enzimas, células, etc. promete aumentar a velocidade, eficiência e segurança da pesquisa biomédica. A biologia computacional também possibilitará que os cientistas realizem experimentos *in silico*, cujos espectros, riscos ou natureza os tornem inacessíveis ou inapropriados para o laboratório convencional ou para as condutas clínicas convencionais.

IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR HOMOLOGIA

Um método importante para a identificação, também chamado de **anotação**, de proteínas novas e produtos genéticos novos compara as sequências das novas proteínas com aquelas de proteínas cujas funções ou estruturas foram determinadas. Em termos práticos, as pesquisas por homologia e as comparações de múltiplas sequências operam sobre o princípio de que as proteínas que realizam funções similares compartilharão os domínios conservados ou outros aspectos de sequência ou **motivos**, e vice-versa (**Figura 10-2**). Entre os muitos algoritmos desenvolvidos para essa finalidade, o mais amplamente empregado é o **BLAST**.

BLAST

O **BLAST** (**Basic Local Alignment Search Tool**) e outros algoritmos de alinhamento/comparação de sequência têm suas origens nos esforços dos antigos biólogos moleculares para determinar se as semelhanças observadas na sequência entre proteínas que realizam funções metabólicas paralelas eram indicativos de alterações progressivas em uma proteína ancestral comum. O principal problema evolucionário abordado foi se as semelhanças refletiam (1) a descendência originária de uma proteína ancestral comum (**evolução divergente**) ou (2) a seleção independente de um mecanismo comum para satisfazer alguma necessidade celular específica (**evolução convergente**), como se poderia prever se uma determinada solução fosse nitidamente superior às alternativas. O cálculo do número mínimo de alterações nucleotídicas necessárias para fazer a interconversão das isoformas da proteína permite que sejam feitas deduções em relação a se as semelhanças e diferenças exibem um padrão indicativo de alteração progressiva decorrente de uma origem compartilhada.

O BLAST evoluiu para uma família de programas otimizados para abordar necessidades e conjuntos de dados específicos. Assim, o **blastp** compara uma sequência assinalada de *aminoácidos* contra uma base de dados de sequência de *proteína*; o **blastn** com-

Língua	Palavra	Alinhamento
Inglês	PHYSIOLOGICAL	PHYSIOLOGI-CAL
Francês	PHYSIOLOGIQUE	PHYSIOLOGI-QUE
Alemão	PHYSIOLOGISCH	PHYSIOLOGISCH
Holandês	FYSIOLOGISCH	F-YSIOLOGISCH
Espanhol	FYSIOLOGICO	F-YSIOLOGI-CO
Polonês	FIZJOLOGICZNY	F-IZJOLOGI-CZNY

FIGURA 10-2 Representação de alinhamento múltiplo de uma sequência. As línguas evoluem de uma maneira que imita aquela dos genes e proteínas. A palavra inglesa *physiological* é mostrada em diversas línguas. O alinhamento demonstra seus aspectos conservados. Identidades com a língua inglesa são mostradas em vermelho escuro, as similaridades linguísticas em azul-escuro. Os algoritmos de alinhamento de múltipla sequência identificam as letras dos nucleotídeos e aminoácidos conservados no DNA, RNA e polipeptídeos de modo análogo.

para uma sequência assinalada de *nucleotídeos* contra uma base de dados de sequência de *nucleotídeos*; o **blastx** compara uma sequência assinalada de *nucleotídeos* traduzida em todos os *frames* de leitura contra uma base de dados de sequência de *proteína* para revelar os produtos de tradução potenciais; o **tblastn** compara uma sequência assinalada de *proteína* contra uma base de dados de sequência de *nucleotídeos* traduzida dinamicamente em todos os seis *frames* de leitura, e o **tblastx** compara as traduções em seis *frames* de leitura de uma sequência assinalada de *nucleotídeos* contra as traduções em seis frames de leitura de uma base de dados de sequência de *nucleotídeos*. Diferente dos múltiplos programas de alinhamento de sequência que se fundamentam nos alinhamentos *globais*, os algoritmos **BLAST** enfatizam as regiões de alinhamento local para detectar as relações entre as sequências apenas com regiões isoladas de semelhança. Essa conduta proporciona velocidade e sensibilidade aumentada para relações de sequência à distância. As sequências "questionadas" ou de entrada são quebradas em "palavras" (tamanho de separação de 11 para nucleotídeos, 3 para aminoácidos). As palavras que se encaixam nas bases de dados são então estendidas em ambas as direções.

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS "DESCONHECIDAS"

Uma parcela substancial dos genes descoberta por projetos de sequenciamento de genoma codifica polipeptídeos hipotéticos ou "desconhecidos", para os quais não existem homólogos de função conhecida. Os bioinformáticos estão desenvolvendo instrumentos para capacitar os cientistas a deduzir a estrutura tridimensional e a função de proteínas crípticas diretamente a partir de suas sequências de aminoácidos. Atualmente, a lista de proteínas desconhecidas reveladas pela genômica contém milhares de entradas, com novas entradas sendo acrescentadas à medida que mais sequências do genoma são solucionadas. A capacidade de gerar estruturas e deduzir a função *in silico* promete acelerar de maneira significativa a identificação de proteínas e fornecer a visão sobre o mecanismo pelo qual as proteínas se dobram. Esse conhecimento ajudará a compreender os mecanismos fundamentais de várias doenças de dobramento de proteína, bem como auxiliará os engenheiros moleculares a idealizar novas proteínas para realizar novas funções.

O código de dobramento

A comparação das proteínas cujas estruturas tridimensionais foram determinadas por cristalografia por raios X ou espectroscopia por RM pode revelar padrões que ligam características específicas da sequência primária a estruturas primárias, secundárias e terciárias específicas - por vezes chamadas de código de dobramento. Os primeiros algoritmos usavam a frequência com a qual aminoácidos individuais ocorriam nas hélices α, folhas β, curvaturas e alças para predizer o número e a localização destes elementos dentro da sequência de um polipeptídeo, conhecido como a topografia da estrutura secundária. Ao estender esse processo, por exemplo, ao pesar o impacto das interações hidrofóbicas na formação do núcleo da proteína, estão sendo desenvolvidos algoritmos de considerável credibilidade preditiva. No entanto, embora os programas atuais apresentem bom desempenho em gerar as conformações das proteínas compreendidas em um único domínio, a projeção da provável estrutura das proteínas de membrana e daquelas compostas por múltiplos domínios ainda se mostra problemática.

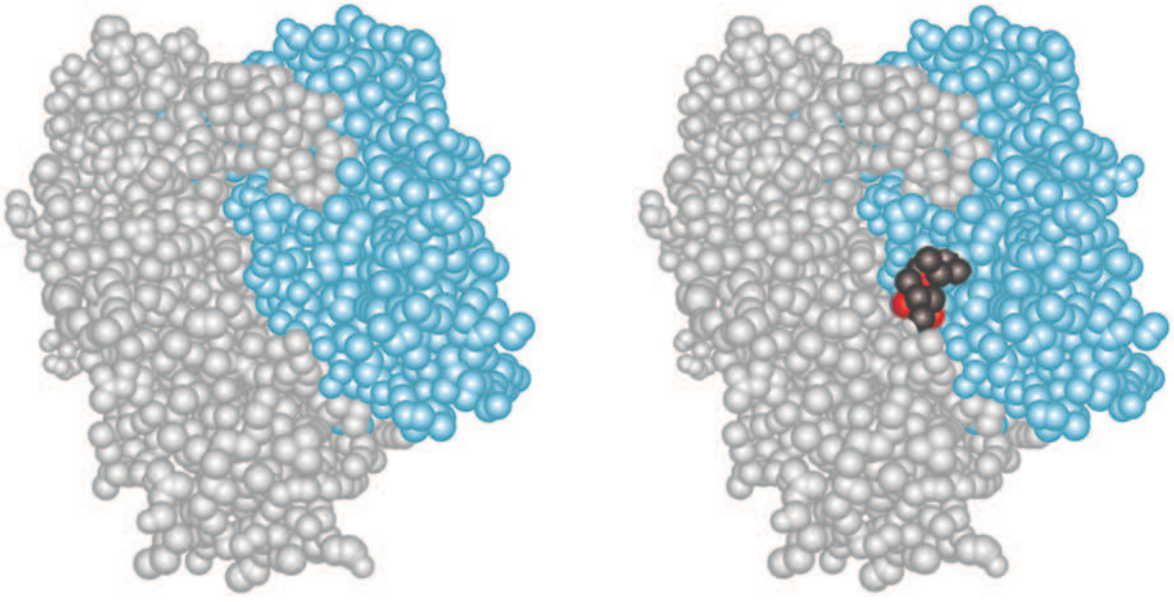


FIGURA 10-3 As representações de volume atômico da HMG-CoA redutase homodimérica são demonstrados a partir da *Pseudomonas mevalonii* com (à direita) e sem (à esquerda) o medicamento estatina lovastatina acoplado. Cada átomo é representado por uma esfera do tamanho de seu raio de van der Waals. As duas cadeias polipeptídicas são coloridas em cinza e azul. Os átomos de carbono da lovastatina são coloridos em preto e os átomos de oxigênio em vermelho. Compare este modelo com as representações estruturais das proteínas mostradas nos Capítulos 5 e 6. (Adaptada de Protein Data Bank ID nº 1t02.)

Relacionando a estrutura tridimensional com a função

Os cientistas também estão tentando discernir os padrões da estrutura tridimensional que se correlacionam com funções fisiológicas específicas. A representação de volume atômico da enzima HMG-CoA redutase e seu complexo com o medicamento lovastatina (**Figura 10-3**) proporciona alguma perspectiva sobre os desafios inerentes à identificação dos sítios de ligação de ligantes desde o ponto de partida. Onde uma estrutura tridimensional completa pode ser determinada ou predita, a superfície da proteína pode ser escaneada para os tipos de bolsas e fendas indicativos de prováveis sítios de ligação para substratos, efetores alostéricos, etc., por qualquer um dos diversos métodos, como o rastreamento de sua superfície com bolas de uma determinada dimensão (**Figura 10-4**). Os mapas de superfície gerados com o programa Graphical Representation and Analysis of Surface Properties, comumente denominados **diagramas GRASP**, destacam as localizações de grupamentos funcionais neutros, com carga negativa e com carga positiva na superfície de uma proteína (**Figura 10-5**) para demonstrar um quadro mais detalhado da biomolécula que se liga ou "aporta" naquele local. A estrutura

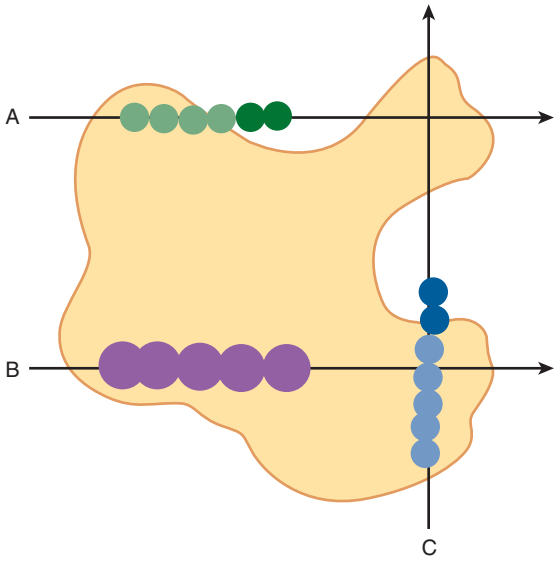


FIGURA 10-4 Representação simplificada de um programa de predição de sítio de ligante. Os programas de predição de sítio de ligante, como POCKET, LIGSITE ou Pocket-Finder, convertem a estrutura tridimensional de uma proteína em um conjunto de coordenadas para seus átomos componentes. Uma fatia bidimensional do espaço preenchido por estas coordenadas é apresentada como um contorno com formato irregular (amarelo). Uma sonda arredondada é então repetidamente passada através destas coordenadas ao longo de uma série de linhas paralelas entre si dos três eixos das coordenadas (A, B, C). Os círculos com sombreado claro representam as posições da sonda onde seu raio se sobrepõe a um ou mais átomos no conjunto de coordenadas cartesianas. Os círculos com coloração intensa representam as posições onde nenhuma coordenada de átomo de proteína cai dentro do raio da sonda. A fim de qualificar como uma bolsa ou rachadura dentro da proteína, e não apenas como um espaço aberto fora dela, a sonda deve encontrar, mais adiante, átomos de proteína que se situam no outro lado da abertura (C).

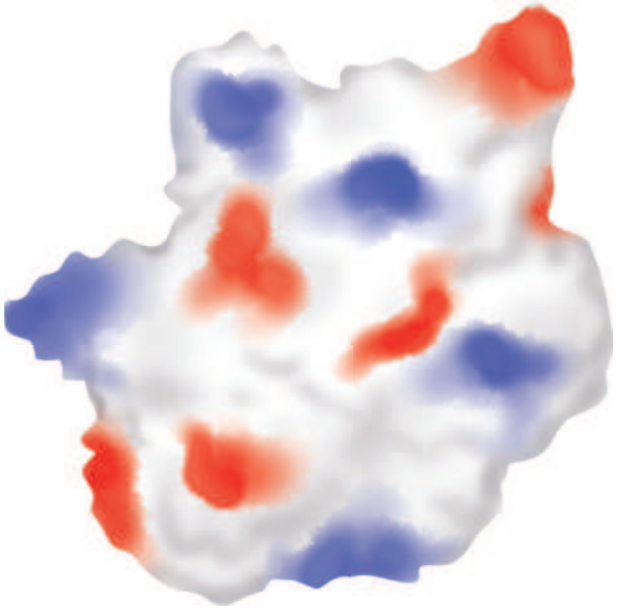


FIGURA 10-5 Representação de um diagrama GRASP indicando a topografia eletrostática de uma proteína. Evidencia-se uma representação de volume atômico de uma proteína hipotética. As áreas sombreadas em vermelho indicam a presença de cadeias laterais de aminoácido ou outras moléculas na superfície da proteína preditas por comportar uma carga negativa em pH neutro. O azul indica a presença dos grupamentos positivamente carregados previstos. O branco denota as áreas preditas como neutras do ponto de vista eletrostático.

predita dos ligantes que se ligam a uma proteína desconhecida, juntamente a outras características estruturais e motivos de sequência, pode então fornecer aos cientistas os indícios necessários para fazer uma "suposição adequada" em relação à(s) sua(s) função(ões) biológica(s).

DESIGN DE MEDICAMENTO ASSISTIDO POR COMPUTADOR

O **Design de Medicamento Assistido por Computador** (**CADD**) emprega o mesmo tipo de algoritmos de *docking* molecular utilizado para identificar os ligantes para proteínas desconhecidas. No entanto, neste caso, o conjunto de ligantes potenciais a ser considerado não está restrito àqueles que ocorrem na natureza e é auxiliado pelo conhecimento empírico da estrutura ou características funcionais da proteína alvo.

Algoritmos de aporte (*docking*) molecular

Para proteínas com estrutura tridimensional conhecida, as condutas de *docking* molecular empregam programas que tentam adaptar uma série de "*pegs*" ligantes potenciais em um sítio de ligação designado, ou "buraco", em um molde de proteína. Para identificar os ligantes ótimos, os programas de *docking* devem considerar as formas apropriadas, bem como a presença e a posição de atributos hidrofóbicos, hidrofílicos e de carga complementares. As afinidades de ligação dos inibidores selecionados com base em estudos

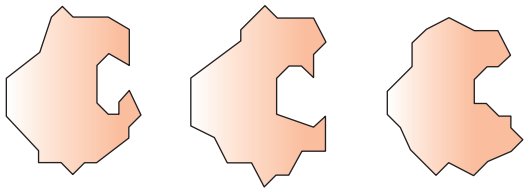


FIGURA 10-6 Representação bidimensional de um conjunto de confôrmeros de uma proteína. Observe como o formato do sítio de ligação se modifica.

de *docking* iniciais foram desapontadoras, pois os modelos rígidos para proteínas e ligantes empregados foram incapazes de replicar as alterações conformacionais que acontecem tanto no ligante quanto na proteína como consequência da ligação, um fenômeno referido como "encaixe induzido" (Capítulo 7).

No entanto, imbuir às proteínas e aos ligantes flexibilidade conformacional requer extenso poder de computação. Desta maneira, surgiram condutas híbridas que empregam um conjunto, ou totalidade, de moldes que representam conformações ligeiramente diferentes da proteína (**Figura 10-6**), ou empregam os conjuntos de conformadores de ligantes (**Figura 10-7**) e de ligantes em que se permite que apenas algumas ligações selecionadas rodem livremente. Uma vez limitado um conjunto de ligantes potenciais, análises de *docking* mais sofisticadas podem ser realizadas para identificar os ligantes de alta afinidade capazes de interagir com seu alvo proteico por meio do espectro de estados conformacionais do último.

Relações de estrutura-atividade

Quando nenhum molde estrutural está disponível para a proteína em questão, os computadores podem ser empregados para ajudar na busca por inibidores de alta afinidade ao calcular e projetar as **Relações de Estrutura-Atividade** (**SARs**). Nesse processo, as afinidades de ligação medidas para vários inibidores conhecidos são comparadas e contrastadas para determinar se as características químicas específicas trazem contribuições termodinâmicas positivas ou negativas para a ligação com o ligante. Essa informação pode ser então usada para pesquisar as bases de dados de compostos químicos, de modo a identificar aqueles com a combinação mais promissora das características positivas *versus* as negativas.

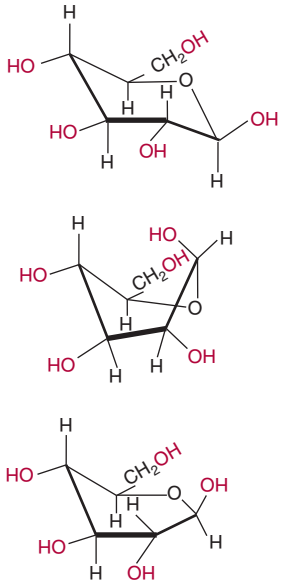


FIGURA 10-7 Confôrmeros de um ligante simples. São mostradas três das muitas conformações diferentes da glicose, comumente referidas como cadeira (acima), barco (meio) e meia cadeira (abaixo). Observe as diferenças não apenas no formato e na compactação, mas também na presença de grupamentos hidroxila, participantes potenciais nas pontes de hidrogênio, conforme ressaltado em vermelho.

BIOLOGIA DE SISTEMAS E CÉLULAS VIRTUAIS

A meta da biologia dos sistemas consiste em construir diagramas de circuito molecular

O que aconteceria se um cientista pudesse detectar, em poucos momentos, o efeito de inibir determinada enzima, de substituir determinado gene, da resposta de uma célula muscular à insulina, da proliferação de uma célula cancerosa ou da produção de beta-amiloide ao submeter uma pergunta adequada em um computador? A meta da **biologia de sistemas** é construir o equivalente molecular dos diagramas de circuito que demonstrem fielmente os componentes de uma determinada unidade funcional e as interações entre eles em termos lógicos ou matemáticos. Essas unidades funcionais podem variar em tamanho e complexidade, a partir das enzimas e metabólitos dentro de uma via de biossíntese até a rede de proteínas que controla o ciclo da divisão celular e, por fim, células, órgãos e organismos inteiros. Então, esses modelos podem ser utilizados para realizar experimentos "virtuais" que podem aumentar a velocidade e a eficiência de pesquisas empíricas ao identificar as linhas mais promissoras da pesquisa e ao auxiliar na avaliação dos resultados. Talvez de forma mais significativa, a capacidade de empreender experimentos virtuais aumenta o alcance do pesquisador, dentro dos limites de exatidão do modelo, além do alcance da tecnologia empírica atual.

Neste momento, está sendo feito um progresso significativo. Ao construir redes moleculares virtuais, os cientistas têm sido capazes de determinar como as cianobactérias montam um ciclo circadiano confiável usando apenas quatro proteínas. Os modelos de via de sinalização de receptor de célula T revelaram como seu circuito molecular foi arranjado para produzir respostas semelhantes a mudanças após a estimulação por complexo de histocompatibilidade maior de peptídeos agonistas em uma célula apresentadora de antígeno. Os cientistas podem usar os hiatos encontrados na modelagem de sistemas moleculares e celulares para orientar a identificação e anotação dos pedaços proteicos remanescentes, da mesma maneira que alguém resolve um quebra-cabeça observando os pedaços restantes para a compatibilidade com os espaços vazios no jogo. Essa conduta de engenharia invertida foi empregada com sucesso para definir a função das glicerato 2-quinases do tipo II nas bactérias e para identificar a síntese de folato "críptica" e os genes de transporte em vegetais.

Células virtuais

Recentemente, os cientistas foram capazes de criar com sucesso uma rede metabólica sustentável, composta por quase duas centenas de proteínas – etapa importante no sentido da criação de uma **célula virtual**. O "santo graal" dos biólogos de sistemas consiste em replicar o comportamento das células humanas vivas *in silico*. Os benefícios potenciais dessas células virtuais são enormes. Não somente elas permitirão que os sítios ótimos para a intervenção terapêutica sejam identificados de maneira rápida e inequívoca, mas que os efeitos colaterais indesejados possam ser revelados antes da decisão de investir tempo e recursos na síntese, na análise e em experimentações de um farmacóforo potencial. A capacidade de realizar a triagem toxicológica rápida e econômica de materiais, variando desde herbicidas a cosméticos, irá beneficiar a saúde humana. As células virtuais também podem ajudar no diagnóstico. Ao manipular uma célula virtual para reproduzir o perfil metabólico de um paciente, as anormalidades genéticas subjacentes podem ser reveladas. A interrelação dos diversos fatores ambientais, nutricionais e genéticos que contribuem para doenças multifatoriais, como o câncer, pode ser analisada de maneira sistemática. Os estudos preliminares de terapias genéticas potenciais podem ser avaliados com segurança e rapidez *in silico*.

A duplicação de uma célula viva *in silico* representa uma realização extremamente formidável. A célula virtual não deve apenas ter todas as proteínas e todos os metabólitos para o tipo de célula a ser modelado (p. ex., do cérebro, fígado, nervo, músculo ou tecido adiposo): eles também devem estar presentes na concentração e localização subcelular apropriadas. O modelo também deve considerar a dinâmica funcional de seus componentes, as afinidades de ligação, a eficiência catalítica, as modificações covalentes, etc. Fazer uma célula virtual ser capaz de se dividir ou de se diferenciar envolverá outro avanço extraordinário na complexidade e sofisticação.

Mapas de interação molecular empregam lógica simbólica

Os modelos construídos por biólogos de sistemas podem assumir diversas formas dependendo das utilizações para as quais eles se destinam e dos dados disponíveis para orientar sua construção. Caso haja o desejo de modelar o fluxo de metabólitos por meio de via anabólica ou catabólica, não é suficiente conhecer as identidades e os reagentes envolvidos em cada reação catalisada por enzima. Para se obter os valores matematicamente exatos, é necessário saber as concentrações dos metabólitos em questão, a quantidade de cada uma das enzimas presentes e seus parâmetros catalíticos.

Para a maioria dos usuários, é suficiente saber que um modelo descreve e prediz a natureza qualitativa das interações entre os componentes. Um ligante alostérico ativa ou inibe a enzima? A dissociação de uma proteína complexa leva à degradação de um ou mais dos seus componentes? Para esse propósito, era necessário um conjunto de símbolos demonstrando a lógica simbólica dessas interações. As antigas representações frequentemente usavam os símbolos previamente desenvolvidos para construir fluxogramas (programação de computador) ou circuitos eletrônicos (**Figura 10-8**, em cima). Contudo, por fim, os biólogos de sistemas idealizaram símbolos próprios (Figura 10-8, embaixo) para demonstrar

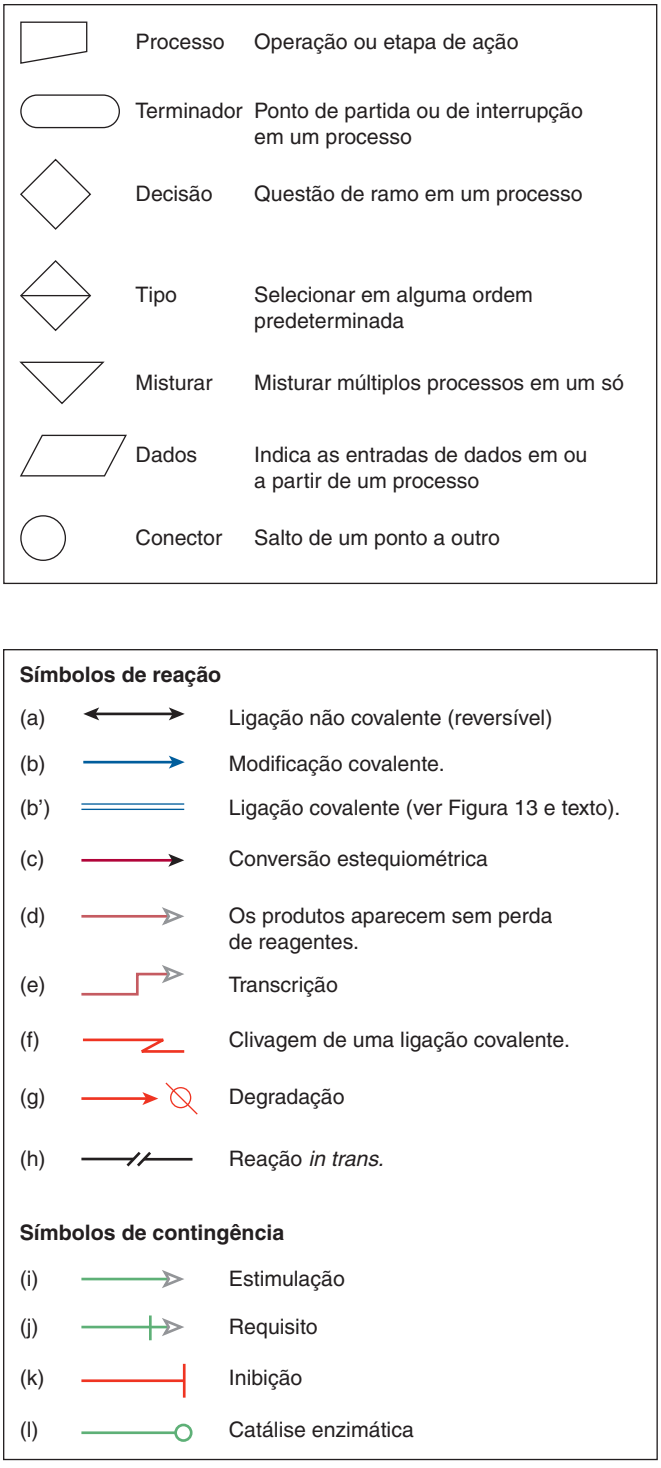


FIGURA 10-8 Símbolos empregados para construir diagramas de circuito molecular na biologia de sistemas. (acima) Amostra de símbolos de fluxograma. (abaixo) Símbolos gráficos para mapas de interação molecular (Adaptada de Kohn KW et al: Molecular interactionmapsofbioregulatory networks: a general rubric for systems biology. Mol BiolCell 2006; 17:1).

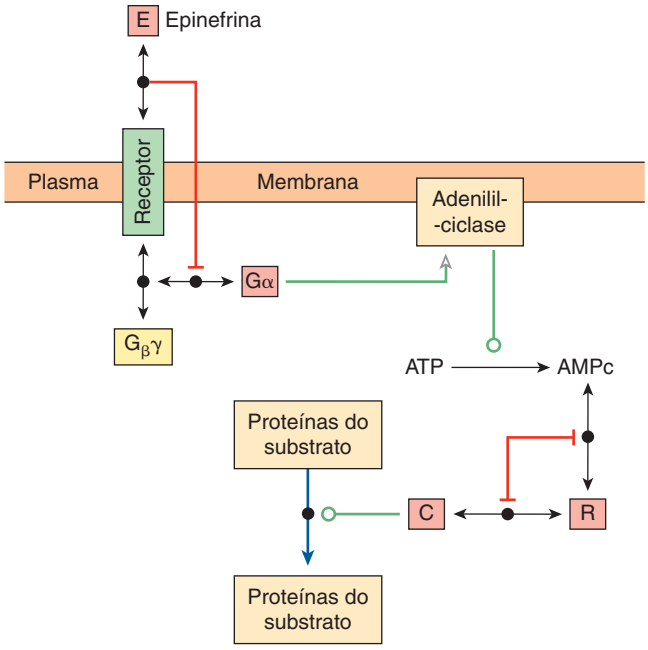


FIGURA 10-9 Representação de uma rede de interação molecular (MIN) demonstrando uma cascata de transdução de sinal que leva à fosforilação das proteínas substratos pela subunidade catalítica, C, da proteinoquinase dependente de AMP cíclico resposta à epinefrina. As proteínas são mostradas como retângulos ou quadrados. As setas duplas indicam a formação de complexo não covalente representado por pontos no ponto médio da seta. As linhas vermelhas com cabeças em forma de T indicam a interação inibitória. A seta verde com cabeça oca indica uma interação estimuladora. A linha verde com círculo aberto no final indica a catálise. A seta azul com P indica a modificação covalente por fosforilação. (Símbolos adaptados de Kohn KW et al: Molecular interaction maps of bioregulatory networks: a general rubric for systems biology. MolBiol Cell 2006; 17:1.)

esses diagramas de circuito molecular, mais comumente referidos como **Mapas de Interação Molecular** (**MIM**), dos quais um exemplo é mostrado na **Figura 10-9**. Infelizmente, como acontece com a nomenclatura das enzimas (Capítulo 7), ainda precisa surgir um conjunto de símbolos universal e consistente.

CONCLUSÃO

Os campos da bioinformática e da biologia computacional com rápida evolução detêm uma promessa sem paralelo para o futuro tanto da medicina quanto da biologia básica. Certas promessas são atualmente percebidas de modo claro, algumas parecem longínquas, outras permanecem inimagináveis. Um importante objetivo dos biólogos computacionais consiste em desenvolver instrumentos de computação que aumentarão a eficiência, a eficácia e a velocidade do desenvolvimento de medicamentos. Os epidemiologistas empregam computadores para, em uma população, extrair padrões indicativos de causas específicas e contribuintes tanto para a doença quanto para a saúde. Parece haver pouca dúvida de que seu impacto sobre a prática médica no século XXI será igual ou irá superar aquele da descoberta da patogênese bacteriana no século XIX.

RESUMO

- A genômica forneceu uma enorme quantidade de informações de grande valor potencial para os cientistas e médicos.
- A bioinformática envolve a idealização de algoritmos de computador e a construção de bases de dados que possibilitam aos cientistas biomédicos o acesso e a análise da crescente avalanche de dados biomédicos.
- O objetivo da epidemiologia consiste em extrair opiniões médicas a partir do comportamento de populações humanas heterogêneas por meio da aplicação de instrumentos estatísticos sofisticados.
- Os principais desafios na construção de bases de dados adequadas incluem a idealização dos meios para armazenar e organizar dados complexos que acomodam uma ampla gama de critérios de pesquisa potenciais.
- O objetivo do Projeto Encode é identificar todos os elementos funcionais dentro do genoma humano.
- As bases de dados HapMap, *Entrez Gene* e dbGAP contêm dados pertinentes à relação das mutações genéticas com as condições patológicas.
- A biologia computacional emprega algoritmos de computador para identificar proteínas desconhecidas e realizar experimentos virtuais.
- O BLAST é usado para identificar os genes e as proteínas desconhecidos por meio da busca para sequências homólogas de função conhecida.
- Os biólogos computacionais estão desenvolvendo programas que irão predizer a estrutura tridimensional das proteínas diretamente a partir de sua sequência primária.
- O design de medicamento assistido por computador acelera a descoberta do medicamento ao tentar encaixar inibidores potenciais em alvos protéicos selecionados *in silico*.
- Uma meta importante dos biólogos de sistema consiste em criar modelos adequados de vias e redes individuais a fim de elucidar os princípios funcionais e realizar experiências virtuais.
- O objetivo final dos biólogos de sistema é criar células virtuais que possam ser usadas para diagnosticar e tratar doenças de modo mais seguro e eficiente, em particular àquelas de natureza multifatorial.
- Os biólogos de sistema comumente constroem representações esquemáticas conhecidas como mapas de interação molecular, nos quais a lógica simbólica é empregada para ilustrar as relações entre os componentes que constituem uma via ou alguma outra unidade funcional.

REFERÊNCIAS

Altschul SF, Gish W, Miller W, et al: Basic local alignment search tool. J Mol Biol 1990;215:403.

Collins FS, Barker AD: Mapping the human cancer genome. Sci Am 2007;296:50.

Collins FS, Green ED, Guttmacher AE, et al: A vision for the future of genomics research. A blueprint for the genomic era. Nature 2003;422:835.

Couzin J: The HapMap gold rush: researchers mine a rich deposit. Science 2006;312:1131.

Cravatt BF, Wright AT, Kozarich JW: Activity-based protein profiling: from enzyme chemistry to proteomic chemistry. Annu Rev Biochem 2008;77:383.

Debes JD, Urrutia R: Bioinformatics tools to understand human diseases. Surgery 2004;135:579.

Dunning Hotopp JC, Grifantini R, Kumar N, et al: Comparative genomics of *Neisseria meningitides:* core genome, islands of horizontal transfer and pathogen-specific genes. Microbiology 2006;152:3691.

Ekins S, Mestres J, Testa B: *In silico* pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond. Br J Pharmacol 2007;152:21.

Ekins S, Mestres J, Testa B: *In silico* pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. Br J Pharmacol 2007;152:9.

Kaiser J: Affordable 'exomes' fill gaps in a catalog of rare diseases. Science 2010;330:903.

Kim JH: Bioinformatics and genomic medicine. Genet Med 2002;4:62S.

Kohn KW, Aladjem MI, Weinstein JN, et al: Molecular interaction maps of bioregulatory networks: a general rubric for systems biology. Mol Biol Cell 2006; 17:1.

Koonin EV, Galperin MY: *Sequence—Evolution—Function. Computational Approaches to Comparative Genomics.* Kluwer Academic Publishers, 2003.

Laurie ATR, Jackson RM: Methods for prediction of protein–ligand binding sites for structure-based drug design and virtual ligand screening. Curr Prot Peptide Sci 2006; 7:395–406.

McInnes C: Virtual screening strategies in drug discovery. Curr Opin Cell Biol 2007;11:494.

Nebert DW, Zhang G, Vesell ES: From human genetics and genomics to pharmacogenetics and pharmacogenomics: past lessons, future directions. Drug Metab Rev 2008; 40:187.

Sansom C: Genes and disease. The Scientist 2008;30:34.

Slepchenko BM, Schaff JC, Macara I, et al: Quantitative cell biology with the Virtual Cell. Trends Cell Biol 2003; 13:570.

Sudmant PH, Kitzman JO, Antonacci F, et al: Diversity of human gene copy number variation and multicopy genes. Science 2010; 330:641.

Villoutreix BO, Renault N, Lagorce D, et al: Free resources to assist structure-based virtual ligand screening experiments. Curr Protein Pept Sci 2007;8:381.

Questões para Estudo

Seção I

1. A propensão dos átomos de água para formar pontes de hidrogênio entre si é o principal fator responsável por todas as seguintes propriedades da água, EXCETO:
   A. Seu ponto de ebulição atipicamente alto.
   B. Seu alto calor de vaporização.
   C. Sua alta tensão superficial.
   D. Sua capacidade de dissolver hidrocarbonetos.
   E. Sua expansão perante o congelamento.
2. Selecione a única alternativa que NÃO ESTÁ CORRETA:
   A. As cadeias laterais dos aminoácidos cisteína e metionina absorvem a luz visível.
   B. A glicina está frequentemente presente nas regiões onde um polipeptídeo forma uma curvatura acentuada, revertendo a direção de um polipeptídeo.
   C. Os polipeptídeos são nomeados como derivados do resíduo aminoacil C-terminal.
   D. Os átomos de C, N, O e H de uma ligação peptídica são coplanares.
   E. Um polipeptídeo linear contém quatro ligações peptídicas.
3. Selecione a única alternativa que NÃO ESTÁ CORRETA:
   A. Os tampões dos tecidos humanos incluem o bicarbonato, as proteínas e o ortofosfato.
   B. Um ácido fraco ou uma base fraca exibe sua capacidade de tamponamento máxima quando o pH é igual a seu pK_a mais ou menos uma unidade de pH.
   C. O pH isoelétrico (pI) da lisina pode ser calculado ao se empregar a fórmula (pK_2 + pK_3)/2.
   D. A mobilidade de um ácido fraco monofuncional em um campo elétrico de corrente direta alcança seu máximo quando o pH de seu ambiente adjacente é igual a seu pK_a.
   E. Para simplificação, as forças das bases fracas geralmente são expressas como o pK_a de seus ácidos conjugados.
4. Selecione a única das alternativas que NÃO ESTÁ CORRETA:
   A. Quando o pK_a de um ácido fraco é 4,0, 50% de suas moléculas estarão no estado dissociado quando o pH do ambiente adjacente for 4,0.
   B. Um ácido fraco com um pK_a de 4,0 será um tampão mais efetivo em pH 3,8 do que em pH 5,7.
   C. Em um pH igual a seu pI, um polipeptídeo não comporta grupamentos carregados.
   D. Os ácidos e as bases fortes são assim denominados porque sofrem dissociação completa quando dissolvidos em água.
   E. O pK_a de um grupamento ionizável pode ser influenciado pelas propriedades físicas e químicas de seu ambiente adjacente.
5. Selecione a única alternativa que NÃO ESTÁ CORRETA:
   A. Para calcular a K_{eq}, a constante de equilíbrio para uma reação, divida a velocidade inicial da velocidade de reação anterógrada (velocidade$_1$) pela velocidade inicial da reação reversa (velocidade$_{-1}$).
   B. A presença de uma enzima não tem efeito sobre a K_{eq}.
   C. Para uma reação realizada em temperatura constante, a fração das moléculas reagentes potenciais que possuem energia cinética suficiente para superar a energia de ativação da reação é uma constante.
   D. As enzimas e outros catalisadores diminuem a energia de ativação das reações.
   E. O sinal algébrico de ΔG, a alteração de energia livre de Gibbs para uma reação, indica a direção em que uma reação prosseguirá.
6. Selecione a única alternativa que NÃO ESTÁ CORRETA:
   A. Conforme empregado em bioquímica, a concentração no estado padrão para produtos e reagentes diferentes de prótons é 1 molar.
   B. O ΔG é uma função do logaritmo da K_{eq}.
   C. Quando usado na cinética da reação, o termo "espontaneidade" se refere ao fato de que a reação quando escrita sofre favorecimento para prosseguir da esquerda para a direita.
   D. O ΔG^0 indica a alteração na energia livre que acompanha a transição do estado padrão para o equilíbrio.
   E. Após alcançar o equilíbrio, as velocidades das reações anterógrada e reversa caem, ambas, até zero.
7. Selecione a única alternativa que NÃO ESTÁ CORRETA:
   A. As enzimas diminuem a energia de ativação de uma reação.
   B. Uma maneira pela qual as enzimas diminuem a energia de ativação é feita pela desestabilização dos intermediários do estado de transição.
   C. Os resíduos histidil do sítio ativo frequentemente ajudam a catálise ao agir como doadores ou aceptores de próton.
   D. A catálise covalente é empregada por algumas enzimas para proporcionar uma via de reação única.
   E. A presença de uma enzima não tem efeito sobre o ΔG^0.
8. Selecione a única alternativa que NÃO ESTÁ CORRETA:
   A. Para a maioria das enzimas, a relação da [S] e a velocidade de reação inicial, v_i, fornece uma curva hiperbólica.
   B. Quando [S] é muito menor que K_m, o termo K_m + [S] na equação de Michaelis-Menten aproxima-se muito de K_m. Sob estas condições, a velocidade da catálise é uma função linear de [S].
   C. As concentrações molares do substrato e dos produtos são iguais quando a velocidade de uma reação catalisada por enzima atinge a metade de seu máximo potencial ($V_{máx}/2$).
   D. Diz-se que uma enzima ficou saturada pelo substrato quando a elevação sucessiva da [S] falha em produzir um aumento significativo na v_i.
   E. Quando se realiza mensurações da velocidade no estado de equilíbrio, a concentração dos substratos deve superar em muito àquela da enzima catalisadora.
9. Selecione a única alternativa que NÃO ESTÁ CORRETA:
   A. Determinadas enzimas monoméricas exibem cinética de velocidade inicial sigmoidal.

B. A equação de Hill é usada para realizar a análise quantitativa do comportamento cooperativo das enzimas ou de proteínas carreadoras como a hemoglobina ou calmodulina.
C. Para uma enzima que exibe ligação cooperativa do substrato, diz-se que um valor de n (o coeficiente de Hill) é maior que a unidade exibe cooperatividade positiva.
D. Diz-se que uma enzima que catalisa uma reação entre dois ou mais substratos opera por um mecanismo sequencial quando os substratos devem se ligar em uma ordem predeterminada.
E. Os grupamentos prostéticos capacitam as enzimas a acrescentar capacidades além daquelas fornecidas pelas cadeias laterais de aminoácidos.

10. Selecione a única alternativa que NÃO ESTÁ CORRETA:
A. A IC_{50} é um termo operacional simples para expressar a potência de um inibidor.
B. Os gráficos de Lineweaver-Burk e Dixon empregam versões rearranjadas da equação de Michaelis-Menten para produzir representações lineares da inibição e do comportamento cinético.
C. Um gráfico de $1/v_i$ *versus* 1/[S] pode ser empregado para avaliar o tipo e a magnitude de um inibidor.
D. Os inibidores não competitivos simples diminuem a K_m aparente para um substrato.
E. Comumente, os inibidores não competitivos comportam pouca ou nenhuma semelhança estrutural com o(s) substrato(s) de uma reação catalisada por enzima.

11. Selecione a única alternativa que NÃO ESTÁ CORRETA:
A. Para uma determinada enzima, as concentrações intracelulares de seus substratos tendem a ficar próximas de seus valores de K_m.
B. O sequestro de determinadas vias dentro das organelas intracelulares facilita a tarefa da regulação metabólica.
C. A etapa inicial em uma via bioquímica na qual o controle regulador pode ser exercido com eficiência é a primeira etapa comprometida.
D. A regulação por retroalimentação refere-se ao controle alostérico de uma etapa anterior em uma via bioquímica pelo(s) produto(s) final(is) daquela via.
E. O controle metabólico é mais efetivo quando uma das etapas rápidas em uma via é visada para a regulação.

12. Selecione a única alternativa que NÃO ESTÁ CORRETA:
A. Um objetivo importante da proteômica é identificar a totalidade das proteínas presentes em uma célula sob diferentes condições, bem como seus estados de modificação.
B. A espectrometria de massa substituiu em grande parte o método de Edman para o sequenciamento de peptídeos e proteínas.
C. O reagente de Sanger foi um avanço sobre o método de Edman porque o primeiro gera um novo aminoterminal, permitindo que vários ciclos consecutivos de sequenciamento aconteçam.
D. Como a massa é uma propriedade universal de todos os átomos e moléculas, a espectrometria de massa adequa-se bem à detecção de modificações pós-tradução nas proteínas.
E. Os espectrômetros de massa de tempo de voo têm a vantagem da relação F = ma.

13. Selecione a única alternativa que NÃO ESTÁ CORRETA:
A. A cromatografia de troca iônica separa as proteínas com base no sinal e na magnitude de suas cargas em um determinado pH.
B. A eletroforese em gel bidimensional separa as proteínas primeiramente com base em seus valores de pI e, em segundo lugar, por suas proporções de carga por massa usando a SDS.
C. A cromatografia por afinidade explora a seletividade das interações proteína-ligante para isolar uma determinada proteína a partir de uma mistura complexa.
D. Muitas proteínas recombinantes são expressas com um domínio adicional fundido em seu N– ou C-terminal. Um componente comum destes domínios de fusão é um sítio de ligação de ligante destinado expressamente a facilitar a purificação por cromatografia por afinidade.
E. A espectrometria de massa em *tandem* pode analisar os peptídeos derivados de misturas proteicas complexas sem sua separação prévia.

14. Selecione a única alternativa que NÃO ESTÁ CORRETA:
A. O dobramento da proteína é assistida pela intervenção de proteínas auxiliadoras especializadas denominadas chaperonas.
B. O dobramento da proteína tende a ser modular com as áreas da estrutura secundária se formando em primeiro lugar, depois coalescendo em um glóbulo fundido.
C. O dobramento da proteína é dirigida em primeiro lugar e acima de tudo pela termodinâmica das moléculas de água adjacentes ao polipeptídeo nascente.
D. A formação de ligações S-S em uma proteína madura é facilitada pela enzima proteína dissulfeto isomerase.
E. Apenas algumas proteínas incomuns, como o colágeno, requerem processamento pós-tradução por proteólise parcial para atingir sua conformação madura.

15. Selecione a única alternativa que NÃO ESTÁ CORRETA:
A. As modificações pós-tradução das proteínas podem afetar tanto suas funções quanto seus destinos metabólicos.
B. O estado conformacional original geralmente é aquele que é favorecido do ponto de vista termodinâmico.
C. As estruturas tridimensionais complexas da maioria das proteínas são formadas e estabilizadas pelos efeitos cumulativos de um grande número de interações fracas.
D. Os cientistas empregam arranjos genéticos para a detecção de alto débito da presença e do nível de expressão de proteínas.
E. Os exemplos de interações fracas que estabilizam o dobramento da proteína incluem as pontes de hidrogênio, as pontes salinas e as forças de van der Waals.

16. Selecione a única alternativa que NÃO ESTÁ CORRETA:
A. As alterações na configuração envolvem a ruptura de ligações covalentes.
B. As alterações na conformação envolvem a rotação de uma ou mais ligações simples.
C. O gráfico de Ramachandran ilustra o grau em que o impedimento estérico limita os ângulos permissíveis das ligações simples no esqueleto de um peptídeo ou de uma proteína.

D. A formação de uma hélice α é estabilizada pelas pontes de hidrogênio entre cada ligação peptídica do oxigênio da carboxila e o grupamento N-H da próxima ligação peptídica.
E. Em uma folha β, os grupamentos R dos resíduos adjacentes apontam em direções opostas em relação ao plano da folha.

17. Selecione a única alternativa que NÃO ESTÁ CORRETA:
A. O descritor $\alpha_2\beta_2\gamma_3$ denota uma proteína com sete subunidades de três tipos diferentes.
B. As alças são regiões estendidas que conectam regiões adjacentes da estrutura secundária.
C. Mais da metade dos resíduos em uma proteína comum reside em α-hélices ou em folhas β.
D. A maioria das folhas β possui uma torção no sentido da direita.
E. Os príons são vírus que causam doenças de dobramento da proteína que atacam o cérebro.

18. Selecione a única alternativa que NÃO ESTÁ CORRETA:
A. O efeito Bohr refere-se à liberação de prótons que acontece quando o oxigênio se liga à desoxiemoglobina.
B. Logo após o nascimento do lactente humano, a síntese da cadeia α sofre rápida indução até que ela compreenda 50% do tetrâmero da hemoglobina.
C. A cadeia β da hemoglobina fetal está presente durante toda a gestação.
D. As talassemias são defeitos genéticos decorrentes da ausência total ou parcial das cadeias α ou β da hemoglobina.
E. A conformação rígida da hemoglobina é estabilizada por várias pontes salinas que se formam entre as subunidades.

19. Selecione a única alternativa que NÃO ESTÁ CORRETA:
A. O impedimento estérico pela histidina E7 desempenha um papel primordial no enfraquecimento da afinidade da hemoglobina pelo monóxido de carbono.
B. A anidrase carbônica desempenha um papel crítico na respiração em virtude de sua capacidade de clivar o 2,3-bifosfoglicerato nos pulmões.
C. A hemoglobina S é diferenciada por uma mutação genética que substitui o Glu6 na subunidade β por Val, criando uma placa viscosa na superfície.
D. A oxidação do ferro do heme a partir do estado +2 para +3 suprime a capacidade da hemoglobina para se ligar ao oxigênio.
E. As diferenças funcionais entre a hemoglobina e a mioglobina refletem, em grande parte, as diferenças em suas estruturas quaternárias.

20. Selecione a única alternativa que NÃO ESTÁ CORRETA:
A. A rede de retransmissão de carga da tripsina transforma o sítio ativo da serina em um nucleófilo forte.
B. A constante de Michaelis é a concentração do substrato em que a velocidade da reação é a metade da máxima.
C. Durante as reações de transaminação, ambos os substratos são ligados à enzima antes de qualquer produto ser liberado.
D. Os resíduos de histidina atuam tanto como ácidos quanto como bases durante a catálise por uma aspartato protease.
E. Muitas coenzimas e cofatores derivam de vitaminas.

21. Selecione a única alternativa que NÃO ESTÁ CORRETA:
A. As enzimas interconversíveis assumem papéis essenciais nas redes reguladoras integradas.
B. A fosforilação de uma enzima frequentemente altera sua eficiência catalítica.
C. Os "mensageiros secundários" agem como extensões intracelulares ou substitutos para os hormônios e impulsos nervosos que atingem os receptores da superfície celular.
D. A capacidade das proteinoquinases para catalisar a reação reversa que remove um grupamento fosfato é a chave para a versatilidade deste mecanismo regulador molecular.
E. A ativação do zimogênio pela proteólise parcial é irreversível sob condições fisiológicas.

22. Selecione a única alternativa que NÃO ESTÁ CORRETA:
A. A base de dados HapMap focaliza-se na localização e identidade de polimorfismos de nucleotídeo isolado em seres humanos.
B. O Genbank é um depósito de dados nos resultados fenotípicos dos *knockouts* genéticos em seres humanos.
C. O Protein Database, ou PDB, armazena as estruturas tridimensionais das proteínas conforme determinado pela cristalografia por raios X ou por espectroscopia de ressonância magnética (RM).
D. O objetivo do projeto ENCODE consiste em identificar a totalidade dos elementos funcionais do genoma.
E. O BLAST compara as sequências de proteínas e nucleotídeos a fim de identificar as áreas de semelhança.

23. Selecione a única alternativa que NÃO ESTÁ CORRETA:
A. Um importante obstáculo para o design de medicamento assistido por computador reside nas extraordinárias demandas na capacidade de computação exigida para permitir às proteínas e aos ligantes um grau realista de flexibilidade conformacional.
B. A flexibilidade conformacional é necessária para possibilitar que o ligante e a proteína influenciem um ao outro conforme descrito pelo modelo de chave fechadura e de Fischer para a ligação da proteína-ligante.
C. A construção de uma célula virtual poderia proporcionar um meio para detectar de maneira rápida e eficiente os muitos efeitos indesejáveis de medicamentos potenciais sem a necessidade de exames laboratoriais dispendiosos.
D. A biologia de sistemas ressalta a maneira pela qual as conexões entre unidades enzimáticas e outras unidades em uma célula afetam seus desempenhos.
E. Os biólogos de sistema frequentemente empregam a lógica simbólica de programas de computador e circuitos eletrônicos para descrever as interações entre proteínas, genes e metabólitos.

24. Selecione a única alternativa que NÃO ESTÁ CORRETA:
A. As representações GRASP destacam as áreas da superfície de uma proteína que possuem caráter local positivo ou negativo.
B. As simulações de dinâmica molecular parecem reconstruir os tipos e a amplitude de movimento sofridas pelas proteínas conformacionalmente flexíveis.
C. Os pesquisadores utilizam programas de rolagem de bola para localizar as indentações e fendas na superfície de uma proteína, pois elas provavelmente representam os sítios para o ataque pelas proteases.
D. As simulações de acoplamento molecular frequentemente restringem a rotação livre até um grupo apenas pequeno de ligações em um ligante para compatibilizar a força de computação disponível.
E. Discernir as relações de evolução entre as proteínas constitui um dos meios mais efetivos de predizer as prováveis funções de um polipeptídeo recentemente descoberto.

SEÇÃO

II

Bioenergética e Metabolismo dos Carboidratos e Lipídeos

CAPÍTULO

11

Bioenergética: A Função do ATP

Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Relatar a primeira e a segunda lei da termodinâmica e compreender como elas se aplicam aos sistemas biológicos.
- Explicar o que significam os termos energia livre, entropia, entalpia, exergônica e endergônica.
- Observar como as reações endergônicas podem ser dirigidas por meio do acoplamento àquelas que são exergônicas nos sistemas biológicos.
- Compreender o papel dos fosfatos de alta energia, ATP e outros nucleotídeos trifosfato na transferência da energia livre dos processos exergônicos para os endergônicos, possibilitando que eles atuem como a "moeda energética" das células.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A bioenergética, ou termodinâmica bioquímica, é o estudo das alterações da energia que acompanham as reações bioquímicas. Os sistemas biológicos são essencialmente **isotérmicos** e utilizam a energia química para ativar os processos vivos. O modo pelo qual um animal obtém o combustível adequado a partir de seu alimento para prover essa energia é a base da compreensão da nutrição e do metabolismo normais. A morte por **inanição** ocorre quando as reservas de energia disponíveis são exauridas, sendo que determinadas formas de desnutrição estão associadas ao desequilíbrio da energia (**marasmo**). Os hormônios tireoidianos controlam a velocidade de liberação de energia (taxa metabólica) e a doença sobrevém quando eles funcionam de forma errônea. O armazenamento excessivo da energia sobressalente provoca a **obesidade**, condição progressivamente mais comum na sociedade ocidental, e que predispõe a muitas doenças, inclusive à doença cardiovascular e ao diabetes melito tipo 2, além de diminuir a expectativa de vida.

A ENERGIA LIVRE É A ENERGIA ÚTIL EM UM SISTEMA

A variação da energia livre de Gibbs (ΔG) é aquela porção da variação total de energia no sistema que está disponível para realizar o trabalho – isto é, a energia útil, também conhecida como potencial químico.

Os sistemas biológicos se adaptam às leis gerais da termodinâmica

A primeira lei da termodinâmica declara que **a energia total de um sistema, inclusive em seus arredores, permanece constante**. Isso implica que, dentro do sistema total, a energia não é perdida nem ganha durante qualquer alteração. No entanto, a energia pode ser transferida de uma parte do sistema para outra ou ainda ser transformada em outra forma de energia. Nos sistemas vivos, a energia química pode ser transformada em calor ou em energia elétrica, radiante ou mecânica.

A segunda lei da termodinâmica afirma que **a entropia total de um sistema deve aumentar quando um processo ocorre de forma espontânea**. A **entropia** é a extensão da desordem ou da aleatoriedade do sistema e se torna máxima quando se aproxima do equilíbrio. Sob condições de pressão e temperatura constantes, a relação entre a variação da energia livre (ΔG) de um sistema em reação e a variação na entropia (ΔS) é expressa pela seguinte equação, a qual combina as duas leis da termodinâmica:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

em que ΔH é a variação na **entalpia** (calor) e T é a temperatura absoluta.

Nas reações bioquímicas, como o ΔH é aproximadamente igual ao ΔE, a variação total na energia interna da reação, a reação acima pode ser expressa da seguinte maneira:

$$\Delta G = \Delta E - T\Delta S$$

Quando o ΔG é negativo, a reação prossegue de forma espontânea com perda de energia livre; isto é, ela é **exergônica**. Quando, além disso, o ΔG é de grande magnitude, a reação quase chega ao fim e, essencialmente, é irreversível. Por outro lado, quando o ΔG é positivo, a reação prossegue apenas quando a energia livre pode ser ganha; isto é, ela é **endergônica**. Quando, além disso, a magnitude do ΔG é grande, o sistema é estável, com pouca ou nenhuma tendência para que ocorra uma reação. Quando o ΔG é zero, o sistema está em equilíbrio e não acontece nenhuma alteração global.

Quando os reagentes estão presentes em concentrações de 1,0 mol/L, o ΔG^0 é a variação de energia livre padrão. Para as reações bioquímicas, um estado padrão é definido como tendo um pH de 7,0. A variação da energia livre padrão nesse estado padrão é indicada pelo $\Delta G^{0'}$.

A variação de energia livre padrão pode ser calculada a partir da constante de equilíbrio K_{eq}.

$$\Delta G^{0'} = -RT \ln K'_{eq}$$

em que R é a constante do gás e T é a temperatura absoluta (Capítulo 8). É importante notar que o ΔG real pode ser maior ou menor que $\Delta G^{0'}$, dependendo das concentrações dos diversos reagentes, inclusive do solvente, de vários íons e das proteínas.

Em um sistema bioquímico, uma enzima somente acelera a obtenção do equilíbrio; ela nunca altera as concentrações finais dos reagentes em equilíbrio.

OS PROCESSOS ENDERGÔNICOS PROSSEGUEM POR MEIO DO ACOPLAMENTO COM PROCESSOS EXERGÔNICOS

Os processos vitais – p. ex., reações de síntese, contração muscular, condução do impulso nervoso e transporte ativo – obtêm a energia pela ligação química, ou **acoplamento**, às reações oxidativas. Em sua forma mais simples, esse tipo de acoplamento pode ser representado conforme demonstrado na **Figura 11-1**. A conversão do metabólito A no metabólito B ocorre com a liberação de energia livre e está acoplada à outra reação em que a energia livre é necessária para converter o metabólito C no metabólito D. Os termos **exergônico** e **endergônico**, em vez dos termos químicos normais "exotérmico" e "endotérmico", são utilizados para indicar que um processo é acompanhado pela perda ou ganho, respectivamente, de energia livre em qualquer forma, não necessariamente como calor. Na prática, um processo endergônico não pode existir de forma independente, mas deve ser um componente de um sistema exergônico-endergônico acoplado no qual a alteração total global é exergônica. As reações exergônicas são denominadas de **catabolismo** (geralmente, a clivagem ou a oxidação das moléculas de combustível), enquanto as reações de síntese que acumulam substâncias são denominadas de **anabolismo**. Os processos catabólicos e anabólicos combinados constituem o **metabolismo**.

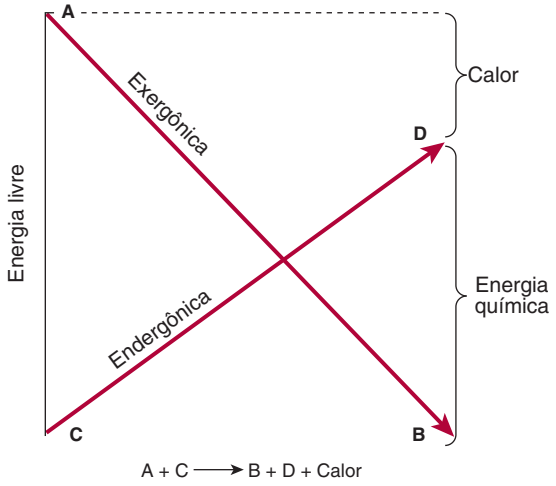


FIGURA 11-1 Acoplamento de uma reação exergônica a uma endergônica.

Quando a reação mostrada na Figura 11-1 ocorre da esquerda para a direita, então o processo global deve ser acompanhado por perda da energia livre como calor. Um possível mecanismo de acoplamento poderia ser idealizado quando um intermediário obrigatório comum (I) toma parte em ambas as reações, isto é,

$$A + C \rightarrow I \rightarrow B + D$$

Algumas reações exergônicas e endergônicas nos sistemas biológicos são ligadas dessa maneira. Esse tipo de sistema possui um mecanismo próprio para o controle biológico da velocidade dos processos oxidativos, pois o intermediário obrigatório comum permite que a velocidade da utilização do produto da via de síntese (D) seja determinada pela velocidade de ação da massa em que A é oxidada. Na verdade, essas relações suprem a base para o conceito do **controle da respiração**, o processo que impede que um organismo fuja do controle. Uma extensão do conceito de acoplamento é fornecida pelas reações de desidrogenação, as quais estão acopladas a hidrogenações por um carreador intermediário (**Figura 11-2**).

Um método alternativo de acoplar um processo exergônico a um endergônico consiste em sintetizar um composto de alto potencial de energia na reação exergônica e o incorporar na reação

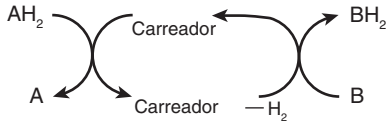


FIGURA 11-2 Acoplamento das reações de desidrogenação e hidrogenação por um transportador intermediário.

endergônica, efetuando, assim, uma transferência de energia livre da via exergônica para a endergônica (**Figura 11-3**). A vantagem biológica desse mecanismo é que o composto de alto potencial de energia, ~Ⓔ, diferente de I no sistema anterior, não precisa estar estruturalmente relacionado com A, B, C ou D, possibilitando que Ⓔ sirva como transdutor de energia de uma ampla gama de reações exergônicas para uma gama igualmente grande de processos ou reações endergônicas, como a biossíntese, a contração muscular, a excitação nervosa e o transporte ativo. Na célula viva, o principal composto carreador ou intermediário de alta energia (designado ~Ⓔ na Figura 11-3) é a **adenosina trifosfato** (**ATP**) (**Figura 11-4**).

OS FOSFATOS DE ALTA ENERGIA DESEMPENHAM UM PAPEL CENTRAL NA CAPTURA E TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA

A fim de manter os processos necessários para a vida, todos os organismos devem obter suprimentos de energia livre a partir de seu ambiente. Os organismos **autotróficos** utilizam processos exergônicos simples; por exemplo, a energia da luz solar (vegetais verdes), a reação $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$ (algumas bactérias). Por outro lado, os organismos **heterotrópicos** obtêm a energia livre ao acoplar seu metabolismo à clivagem de moléculas orgânicas complexas em seu ambiente. Em todos esses organismos, o ATP desempenha um papel central na transferência de energia livre dos processos

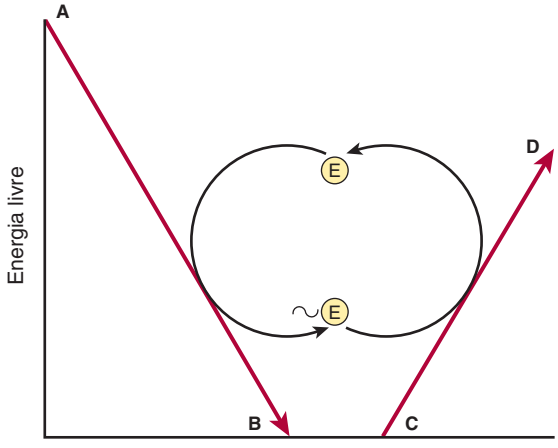


FIGURA 11-3 Transferência de energia livre de uma reação exergônica para uma endergônica por meio de um composto intermediário de alta energia (~Ⓔ).

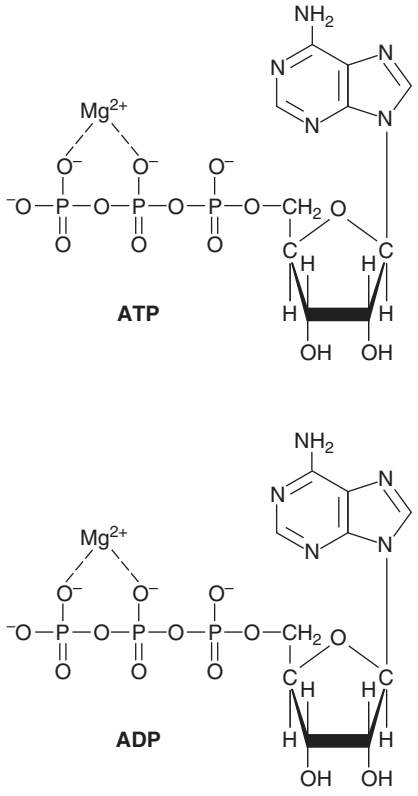


FIGURA 11-4 Adenosina trifosfato (ATP) e adenosina difosfato mostrados como complexos de magnésio.

exergônicos para os processos endergônicos (Figura 11-3). O ATP é um nucleosídio trifosfato que contém adenina, ribose e três grupamentos difosfato. Em suas reações na célula, ele atua como complexo de Mg^{2+} (Figura 11-4).

A importância dos fosfatos no metabolismo intermediário se tornou evidente com a descoberta da função do ATP, da adenosina difosfato (ADP) (Figura 11-4) e do fosfato inorgânico (P_i) na glicólise (Capítulo 18).

O valor intermediário para a energia livre da hidrólise do ATP possui importante significado bioenergético

A energia livre padrão da hidrólise de inúmeros fosfatos bioquimicamente importantes é mostrada na **Tabela 11-1**. Uma estimativa da tendência comparativa de cada um dos grupamentos fosfato para se transferir para um aceptor adequado pode ser obtida a partir do $\Delta G^{0'}$ da hidrólise a 37°C. O valor para a hidrólise do fosfato terminal do ATP divide a lista em dois grupos. Os **fosfatos de baixa energia**, exemplificados pelos éster fosfatos encontrados nos intermediários da glicólise, possuem valores de $G^{0'}$ menores que aqueles do ATP, enquanto nos **fosfatos de alta energia**, o valor é mais elevado que aquele do ATP. Os componentes desse último grupo, inclusive o ATP, comumente os anidridos (p. ex., o 1-fosfato do 1,3-bifosfoglicerato), os enolfosfatos (p. ex., fosfoenolpiruvato) e as fosfoguanidinas (p. ex., creatina fosfato, arginina fosfato).

TABELA 11-1 Energia livre padrão da hidrólise de alguns organofosfatos de importância bioquímica

Composto	$\Delta G^{0'}$ kJ/mol	$\Delta G^{0'}$ kcal/mol
Fosfoenolpiruvato	−61,9	−14,8
Carbamoil fosfato	−51,4	−12,3
1,3-Bifosfoglicerato (para 3-fosfoglicerato)	−49,3	−11,8
Creatina fosfato	−43,1	−10,3
ATP → AMP → PP_i	−32,2	−7,7
ATP → ADP → P_i	−30,5	−7,3
Glicose-1-fosfato	−20,9	−5,0
PP_i	−19,2	−4,6
Frutose-6-fosfato	−15,9	−3,8
Glicose-6-fosfato	−13,8	−3,3
Glicerol-3-fosfato	−9,2	−2,2

Abreviaturas: PP_i, pirofosfato; P_i, ortofosfato inorgânico.
Nota: Todos os valores provenientes de Jencks (1976), exceto aquele para o PP_i, que advém de Frey e Arabshahi (1995). Os valores diferem entre os pesquisadores, dependendo das condições exatas em que foram realizadas as medições.

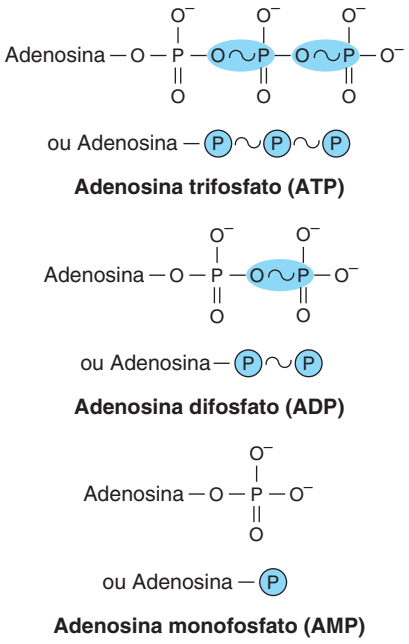


FIGURA 11-5 Estruturas do ATP, ADP e AMP mostrando a posição e a quantidade de fosfatos de alta energia (∼Ⓟ).

O símbolo ∼Ⓟ indica que o grupamento acoplado à ligação, na transferência para um aceptor apropriado, resulta em transferência de maior quantidade de energia livre. Por esse motivo, alguns preferem o termo **potencial de transferência de grupamento**, em vez de "ligação de alta energia". Dessa maneira, o ATP contém dois grupamentos fosfato de alta energia e o ADP contém um, enquanto o fosfato no AMP (adenosina monofosfato) é do tipo de baixa energia, pois ele é uma ligação éster normal (**Figura 11-5**).

A posição intermediária do ATP permite que ele desempenhe um papel importante na transferência de energia. A alteração de alta energia livre na hidrólise do ATP se deve ao alívio da repulsão de carga dos átomos de oxigênio adjacentes, carregados negativamente, e à estabilização dos produtos de reação, em especial o fosfato, como híbridos de ressonância (**Figura 11-6**). Os outros "compostos de alta energia" são os tiol-ésteres que envolvem a coenzima A (p. ex., acetil-CoA), as proteínas carreadoras de acilas, os ésteres de aminoácidos envolvidos na síntese proteica, a *S*-adenosilmetionina (metionina ativa), a UDPGlc (uridina difosfato glicose) e o PRPP (5-fosforibosil-1-pirofosfato).

OS FOSFATOS DE ALTA ENERGIA ATUAM COMO A "MOEDA ENERGÉTICA" DA CÉLULA

O ATP é capaz de agir como um doador de fosfato de alta energia para formar aqueles compostos abaixo dele na Tabela 11-1. Da mesma forma, com as enzimas necessárias, o ADP pode aceitar o fosfato de alta energia para formar o ATP a partir daqueles compostos acima do ATP na tabela. Na prática, um **ciclo de ATP/ADP** conecta aqueles processos que geram ∼Ⓟ àqueles processos que utilizam o ∼Ⓟ (**Figura 11-7**), consumindo e regenerando continuamente o ATP. Isso acontece em uma velocidade muito rápida, pois o *pool* total de ATP/ADP é extremamente pe-

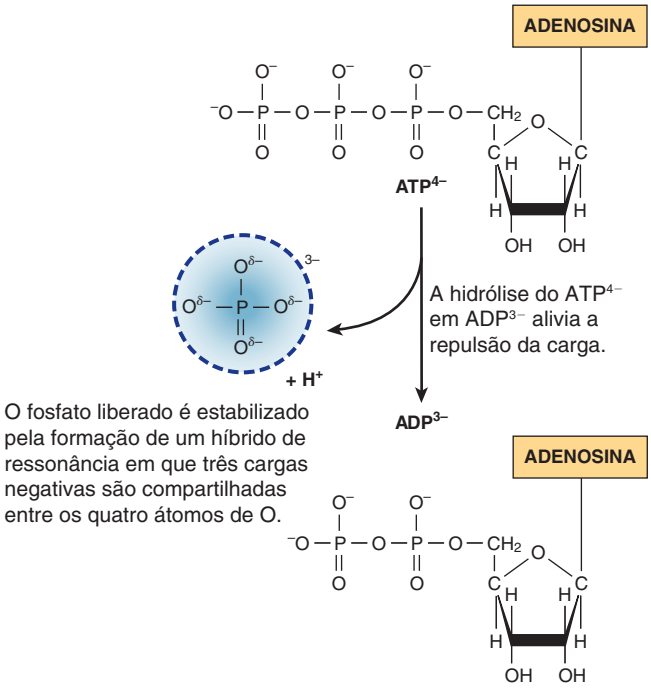


FIGURA 11-6 A variação da energia livre na hidrólise do ATP em ADP.

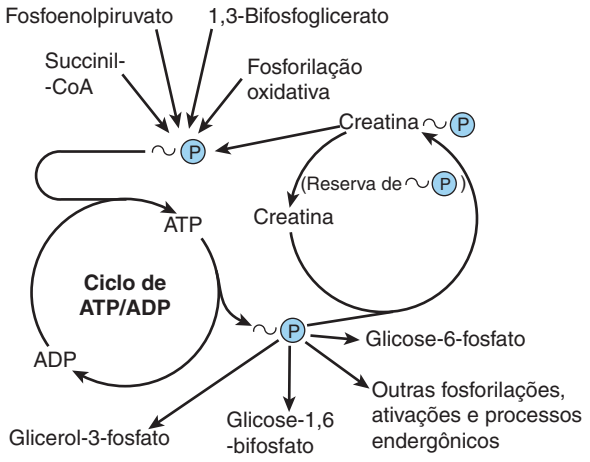


FIGURA 11-7 Papel do ciclo do ATP/ADP na transferência de fosfato de alta energia.

queno e suficiente para manter um tecido ativo por apenas alguns segundos.

Existem três fontes principais de ~Ⓟ que tomam parte na **conservação de energia** ou na **captura de energia**:

1. **Fosforilação oxidativa.** A maior fonte quantitativa de ~Ⓟ nos organismos aeróbios. A energia livre advém da oxidação da cadeia respiratória usando o O_2 molecular dentro das mitocôndrias (Capítulo 12).
2. **Glicólise.** Uma formação global de dois ~Ⓟ resulta da formação de lactato a partir de uma molécula de glicose, gerada em duas reações catalisadas pelo fosfoglicerato quinase e piruvato quinase, respectivamente (Figura 18-2).
3. **O ciclo do ácido cítrico.** Um ~Ⓟ é produzido diretamente no ciclo da etapa da succinato-tioquinase (Figura 17-3).

Os **fosfagênios** agem como formas de armazenamento do fosfato de alta energia e incluem a creatina fosfato, a qual ocorre no músculo esquelético, no coração, nos espermatozoides e no cérebro dos vertebrados, e o fosfato de arginina, que ocorre no músculo invertebrado. Quando o ATP está sendo rapidamente utilizado como fonte de energia para a contração muscular, os fosfagênios permitem que suas concentrações sejam mantidas, mas quando a proporção de ATP/ADP é elevada, suas concentrações podem aumentar para agir como reserva de fosfato de alta energia (**Figura 11-8**).

Quando o ATP age como doador de fosfato para formar aqueles compostos de menor energia livre de hidrólise (Tabela 11-1), o grupamento fosfato é invariavelmente convertido para um de baixa energia, por exemplo

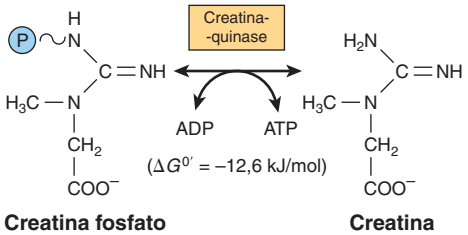
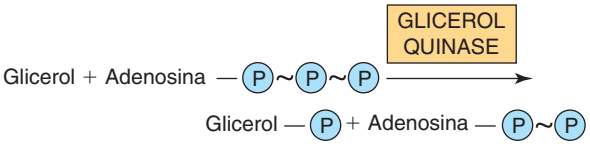


FIGURA 11-8 Transferência de fosfato de alta energia entre ATP e creatinina.



O ATP permite o acoplamento de reações termodinamicamente desfavoráveis naquelas favoráveis

A fosforilação da glicose em glicose-6-fosfato, a primeira reação da glicólise (Figura 18-2), é altamente endergônica e não pode prosseguir sob condições fisiológicas:

$$\text{Glicose} + P_i \rightarrow \text{Glicose-6-fosfato} + H_2O \quad (\Delta G^{0'} = +13{,}8\ \text{kJ/mol}) \qquad \textbf{(1)}$$

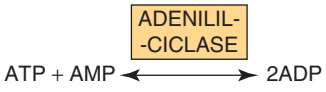
Para ocorrer, a reação deve ser acoplada a outra reação—mais exergônica—como a hidrólise do fosfato terminal do ATP.

$$\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + P_i \ (\Delta G^{0'} = -30{,}5\ \text{kJ/mol}) \qquad \textbf{(2)}$$

Quando (1) e (2) se acoplam em uma reação catalisada pela hexoquinase, a fosforilação da glicose prossegue prontamente em uma reação altamente exergônica que, sob condições fisiológicas, é irreversível. Muitas reações de "ativação" seguem este padrão.

A adenilil-quinase (mioquinase) interconverte os adenina-nucleotídeos

Essa enzima está presente na maioria das células. Ela catalisa a seguinte reação:

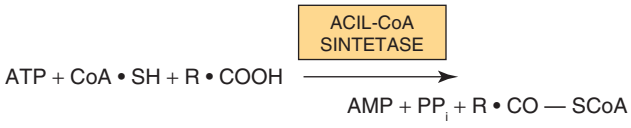


Isso permite:

1. Que o fosfato de alta energia no ADP seja utilizado na síntese do ATP.
2. Que o AMP, formado como consequência de diversas reações de ativação envolvendo o ATP, seja recuperado pela refosforilação em ADP.
3. Que o AMP aumente em concentração quando o ATP fica depletado e atue como sinal metabólico (alostérico) para aumentar a velocidade das reações catabólicas, o que, por sua vez, leva à produção de mais ATP (Capítulo 20).

Quando o ATP forma AMP, o pirofosfato inorgânico (PP_i) é produzido

O ATP também pode ser diretamente hidrolisado em AMP, com a liberação de PP_i (Tabela 11-1). Isso acontece, por exemplo, na ativação dos ácidos graxos de cadeia longa (Capítulo 22).



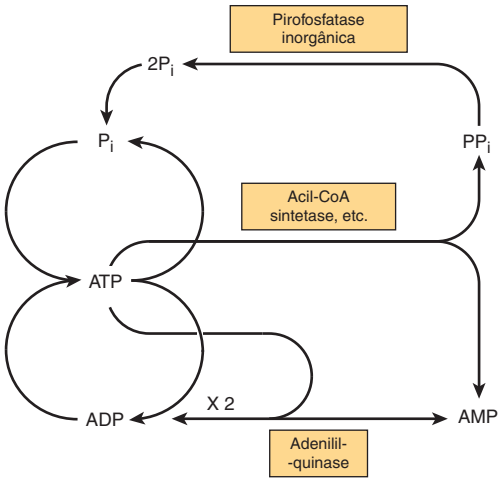
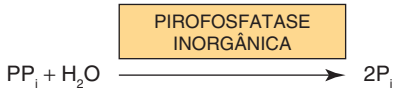


FIGURA 11-9 Ciclos de fosfato e interconversão de adenina-nucleotídeos.

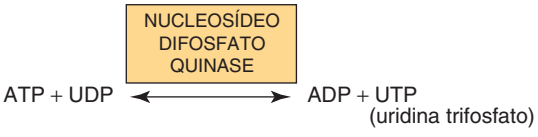
Esta reação é acompanhada pela perda da energia livre como calor, o que assegura que a reação de ativação continuará para a direita e será adicionalmente auxiliada pelo desdobramento hidrolítico do PP_i, catalisada pela **pirofosfatase inorgânica**, reação que, por si só, apresenta um grande $\Delta G^{0'}$ de – 19,2 kJ/mol. Observe que as ativações por meio da via do pirofosfato resultam na perda de dois ~Ⓟ em vez de um, como ocorre quando o ADP e o P_i são formados.



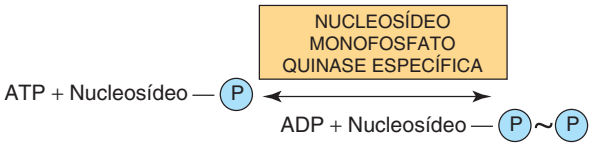
Uma combinação das reações acima possibilita que o fosfato seja reciclado e que haja a interconversão de adenina-nucleotídeos (**Figura 11-9**).

Outros nucleosídeos trifosfato participam na transferência de fosfatos de alta energia

Por meio da enzima **nucleosídeo difosfato quinase**, o UTP, o GTP e o CTP podem ser sintetizados a partir de seus difosfatos, por exemplo, o UDP reage com o ATP para formar o UTP.



Todos esses trifosfatos tomam parte em fosforilações na célula. De mesmo modo, as quinases de nucleosídeos monofosfato específicas catalisam a formação de nucleosídeos difosfato a partir dos monofosfatos correspondentes.



Desta maneira, a adenilil-quinase é uma monofosfato quinase especializada.

RESUMO

- Os sistemas biológicos utilizam a energia química para impulsionar os processos vivos.
- As reações exergônicas acontecem de maneira espontânea com perda da energia livre (o ΔG é negativo). As reações endergônicas requerem o ganho de energia livre (o ΔG é positivo) e ocorrem apenas quando acopladas às reações exergônicas.
- O ATP atua como a "moeda energética" da célula, transferindo a energia livre derivada das substâncias de maior potencial de energia para aquelas de menor potencial de energia.

REFERÊNCIAS

de Meis L: The concept of energy-rich phosphate compounds: water, transport ATPases, and entropy energy. Arch Biochem Biophys 1993;306287.

Frey PA, Arabshahi A: Standard free-energy change for the hydrolysis of the alpha, beta-phosphoanhydride bridge in ATP. Biochemistry 1995;34:11307.

Harold FM: *The Vital Force: A Study of Bioenergetics.* Freeman, 1986.

Harris DA: *Bioenergetics at a Glance: An Illustrated Introduction.* Blackwell Publishing, 1995.

Haynie D: *Biological Thermodynamics.* Cambridge University Press, 2008.

Jencks WP: Free energies of hydrolysis and decarboxylation. In: *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology,* vol 1. *Physical and Chemical Data.* Fasman GD (editor). CRC Press, 1976:296–304.

Klotz IM: *Introduction to Biomolecular Energetics.* Academic Press, 1986.

Nicholls D, Ferguson F: *Bioenergetics.* Elsevier, 2003.

CAPÍTULO

12

Oxidação Biológica

Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e
Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Compreender o significado do potencial redox e explicar como ele pode ser empregado para predizer a direção do fluxo dos elétrons nos sistemas biológicos.
- Identificar as quatro classes de enzimas (oxidorredutases) envolvidas nas reações de oxidação e redução.
- Descrever a ação das oxidases e fornecer exemplos de onde elas desempenham um papel importante no metabolismo.
- Indicar as duas funções principais das desidrogenases e explicar a importância das desidrogenases ligadas ao NAD e à riboflavina nas vias metabólicas como a glicólise, ciclo do ácido cítrico e a cadeia respiratória.
- Reconhecer os dois tipos de enzimas classificados como hidroperoxidases; indicar as reações que elas catalisam e explicar por que elas são importantes.
- Determinar as duas etapas das reações catalisadas por oxigenases e identificar os dois subgrupos importantes desta classe de enzimas.
- Considerar o papel do citocromo P450 na destoxificação de substâncias e na síntese de esteroide.
- Descrever a reação catalisada pela superóxido dismutase e explicar como ela protege os tecidos contra a toxicidade por oxigênio.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Do ponto de vista químico, a **oxidação** é definida como a remoção de elétrons, e a **redução** como o ganho de elétrons. Dessa maneira, a oxidação sempre é acompanhada por redução de um aceptor de elétron. Esse princípio da oxidação-redução se aplica igualmente aos sistemas bioquímicos e constitui um importante conceito que fundamenta a compreensão da natureza da oxidação biológica. Observe que muitas oxidações biológicas podem acontecer sem a participação do oxigênio molecular, por exemplo, as desidrogenações. A vida dos animais superiores é absolutamente dependente de um suprimento de oxigênio para a **respiração**, o processo pelo qual as células derivam a energia na forma de ATP a partir de uma reação controlada do hidrogênio com o oxigênio para formar água. Além disso, o oxigênio molecular é incorporado em diversos substratos por enzimas designadas como **oxigenases**; muitos medicamentos, poluentes e carcinógenos químicos (xenobióticos) são metabolizados por enzimas dessa classe, conhecidas como o **sistema citocromo P450**.

A administração de oxigênio pode salvar a vida no tratamento de pacientes com insuficiência respiratória ou circulatória.

AS VARIAÇÕES NA ENERGIA LIVRE PODEM SER EXPRESSAS EM RELAÇÃO AO POTENCIAL REDOX

Nas reações que envolvem oxidação e redução, a variação da energia livre é proporcional à tendência dos reagentes de doar ou aceitar elétrons. Dessa forma, além de expressar a variação da energia livre em termos de $\Delta G^{0\prime}$ (Capítulo 11), é possível, de forma análoga, expressá-la numericamente como um **potencial de oxidação-redução** ou **redox** (E'_0). O potencial redox de um sistema (E_0) comumente é comparado com o potencial do eletrodo de hidrogênio (0,0 V em pH 0,0). Contudo, para os sistemas biológicos, o potencial redox (E'_0) normalmente é expresso em pH 7,0 no qual o pH do potencial de eletrodo do eletrodo de hidrogênio é −0,42 V.

TABELA 12-1 Alguns potenciais redox de interesse especial em sistemas de oxidação de mamíferos

Sistema	Voltagem do E'_0
H^+/H_2	−0,42
NAD^+/NADH	−0,32
Lipoato; ox/red	−0,29
Acetoacetato/3-hidroxibutirato	−0,27
Piruvato/lactato	−0,19
Oxalacetato/malato	−0,17
Fumarato/succinato	+0,03
Citocromo *b*; Fe^{3+}/Fe^{2+}	+0,08
Ubiquinona; ox/red	+0,10
Citocromo c_1; Fe^{3+}/Fe^{2+}	+0,22
Citocromo *a*; Fe^{3+}/Fe^{2+}	+0,29
Oxigênio/água	+0,82

Os potenciais redox de alguns sistemas redox de interesse especial na bioquímica de mamíferos são mostrados na **Tabela 12-1**. As posições relativas dos sistemas redox na tabela permitem a predição da direção do fluxo dos elétrons de um par redox para outro.

As enzimas envolvidas na oxidação e redução são chamadas de **oxidorredutases** e são classificadas em quatro grupos: **oxidases**, **desidrogenases**, **hidroperoxidases** e **oxigenases**.

AS OXIDASES UTILIZAM O OXIGÊNIO COMO ACEPTOR DE HIDROGÊNIO

As oxidases catalisam a remoção de hidrogênio de um substrato usando o oxigênio como aceptor de hidrogênio.* Elas formam água ou peróxido de hidrogênio como um produto da reação (**Figura 12-1**).

Algumas oxidases contêm cobre

A **citocromo-oxidase** é uma hemoproteína amplamente distribuída em muitos tecidos, possuindo o típico grupamento prostético heme presente na mioglobina, na hemoglobina e em outros citocromos (Capítulo 6). É o componente terminal da cadeia de transportadores respiratórios encontrados na mitocôndria (Capítulo 13) e transfere os elétrons resultantes da oxidação das moléculas de substrato por desidrogenases para seu aceptor final, o oxigênio. A ação da enzima é bloqueada pelo monóxido de carbono, pelo cianeto e pelo sulfeto de hidrogênio, sendo que este causa intoxicação por impedir a respiração celular. Ela também foi denominada de "citocromo a_3". Contudo, sabe-se, atualmente, que o heme a_3 combina-se com outro, o heme *a*, em uma única proteína para formar a enzima complexa citocromo-oxidase e, desta maneira, é mais correto ser chamado de **citocromo *aa*$_3$**. Ele contém duas moléculas de heme, cada qual possuindo um átomo de Fe que oscila entre Fe^{3+} e Fe^{2+} durante a oxidação e a redução. Além disso, dois átomos de Cu estão presentes, cada qual associado a uma unidade heme.

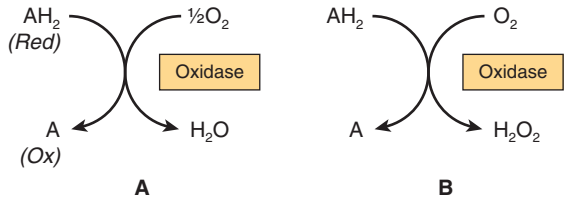


FIGURA 12-1 A oxidação de um metabólito catalisada por uma oxidase (A) que forma H_2O e (B) que forma H_2O_2.

As outras oxidases são flavoproteínas

As enzimas flavoproteínas contêm **flavina mononucleotídeo** (**FMN**) ou **flavina adenina dinucleotídeo** (**FAD**) como grupamentos prostéticos. O FMN e o FAD são formados no organismo a partir da vitamina **riboflavina** (Capítulo 44). Em geral, o FMN e o FAD ligam-se firmemente – mas não de forma covalente – às suas respectivas proteínas apoenzimas. As metaloflavoproteínas contêm um ou mais metais como cofatores essenciais. Os exemplos das enzimas flavoproteínas incluem a **L-aminoácido-oxidase**, uma enzima ligada ao FMN encontrada no rim com especificidade geral para a desaminação oxidativa dos L-aminoácidos de ocorrência natural; a **xantina-oxidase**, que contém molibdênio e desempenha um papel importante na conversão de bases purinas em ácido úrico (Capítulo 33), e é de importância primordial nos animais uricotélicos (Capítulo 28); e a **aldeído-desidrogenase**, uma enzima ligada ao FAD presente no fígado de mamíferos, a qual contém molibdênio e ferro não heme e que atua sobre aldeídos e substratos *N*-heterocíclicos. Os mecanismos de oxidação e redução dessas enzimas são complexos. As evidências sugerem uma reação em duas etapas, conforme demonstrado na **Figura 12-2**.

AS DESIDROGENASES NÃO PODEM UTILIZAR O OXIGÊNIO COMO ACEPTOR DE HIDROGÊNIO

Há um grande número de enzimas na classe das desidrogenases. Elas realizam as seguintes duas funções principais:

1. Transferência de hidrogênio de um substrato para outro em uma reação de oxidação-redução acoplada (**Figura 12-3**). Essas desidrogenases são específicas para seus substratos, porém, com frequência, utilizam coenzimas ou transportadores de hidrogênio comuns, por exemplo, NAD^+. Como as reações são reversíveis, essas propriedades possibilitam reduzir equivalentes para serem livremente transferidos dentro da célula. Esse tipo de reação, que possibilita que um substrato seja oxidado à custa de outro, é particularmente útil ao permitir que aconteçam processos oxidativos na ausência de oxigênio, como durante a fase anaeróbia da glicólise (Figura 18-2).

* N. de T.: O termo "oxidase" é algumas vezes usado coletivamente para nomear todas as enzimas que catalisam reações que envolvem oxigênio molecular.

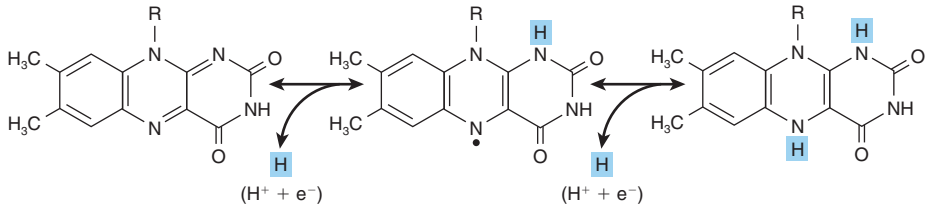


FIGURA 12-2 Oxidorredução do anel de isoaloxazina em nucleotídeos flavina por meio de um intermediário semiquinona (radical livre) (centro).

2. Transferência de elétrons na **cadeia respiratória** de transporte de elétrons do substrato para o oxigênio (Figura 13-3).

Muitas desidrogenases dependem de coenzimas nicotinamida

Estas desidrogenases utilizam a **nicotinamida adenina dinucleotídeo** (**NAD**$^+$) ou a **nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato** (**NADP**$^+$) – ou ambas – que são formados no organismo a partir da vitamina **niacina** (Capítulo 44). As coenzimas são reduzidas pelo substrato específico da desidrogenase e reoxidadas por um aceptor de elétron apropriado (**Figura 12-4**). Elas são capazes de se dissociar de modo livre e reversível de suas respectivas apoenzimas.

Em geral, as **desidrogenases ligadas ao NAD** catalisam as reações de oxidorredução nas vias oxidativas do metabolismo, principalmente na glicólise (Capítulo 18), no ciclo do ácido cítrico (Capítulo 17) e na cadeia respiratória das mitocôndrias (Capítulo 13). As desidrogenases ligadas ao NADP são caracteristicamente encontradas nas sínteses redutoras, como na via extramitocondrial da síntese do ácido graxo (Capítulo 23) e na síntese de esteroide (Capítulo 26) – bem como na via das pentoses fosfato (Capítulo 21).

As outras desidrogenases dependem da riboflavina

Os **grupamentos flavina** associados a essas desidrogenases são semelhantes a FMN e a FAD que ocorrem nas oxidases. Em geral, eles se ligam mais firmemente às suas apoenzimas que as coenzimas nicotinamida. Grande parte das **desidrogenases ligadas à riboflavina** relaciona-se com o transporte de elétron dentro (ou para) da cadeia respiratória (Capítulo 13). A **NADH desidrogenase** age como um transportador de elétrons entre o NADH e os componentes de potencial redox mais elevado (Figura 13-3).

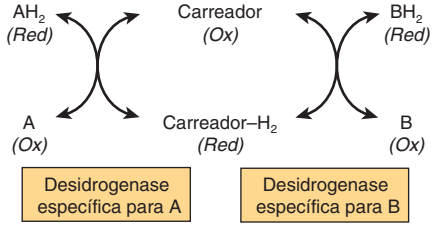


FIGURA 12-3 Oxidação de um metabólito catalisado por desidrogenases acopladas.

Outras desidrogenases, como a **succinato-desidrogenase**, **acil-CoA-desidrogenase** e a **glicerol-3-fosfato-desidrogenase mitocondrial**, transferem equivalentes de redução diretamente do substrato para a cadeia respiratória (Figura 13-5). Outro papel das desidrogenases dependentes de riboflavina é na desidrogenação (por meio da **di-hidrolipoil-desidrogenase**) do lipoato reduzido, um intermediário na descarboxilação oxidativa do piruvato e do α-cetoglutarato (Figuras 13-5 e 18-5). A **flavoproteína-transferidora de elétron** (**ETF**) é um transportador intermediário de elétrons entre a acil-CoA-desidrogenase e a cadeia respiratória (Figura 13-5).

Os citocromos também podem ser considerados desidrogenases

Os **citocromos** são hemoproteínas portadoras do grupamento heme nas quais o átomo de ferro oscila entre Fe^{3+} e Fe^{2+} durante a oxidação e a redução. Exceto pela citocromo-oxidase (previamente descrita), eles são classificados como desidrogenases. Na cadeia respiratória, estão envolvidos como transportadores de elétrons a partir das flavoproteínas em um lado para a citocromo oxidase no outro (Figura 13-5). Diversos citocromos identificáveis ocorrem na cadeia respiratória, isto é, os citocromos *b*, c_1, *c* e a citocromo-oxidase. Os citocromos também são encontrados em outros locais, por exemplo, no retículo endoplasmático (citocromos P450 e b_5) e em células vegetais, bactérias e leveduras.

AS HIDROPEROXIDASES UTILIZAM O PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO OU UM PERÓXIDO ORGÂNICO COMO SUBSTRATO

Dois tipos de enzimas encontrados tanto em animais quanto em vegetais se situam nestas categorias: **peroxidases** e **catalase**.

As hidroperoxidases protegem o organismo contra os peróxidos perigosos. O acúmulo de peróxidos pode levar à produção de radicais livres, os quais, por sua vez, podem romper membranas e, talvez, provocar doenças, incluindo o câncer e a aterosclerose (ver Capítulos 15 e 44).

As peroxidases reduzem os peróxidos empregando diversos aceptores de elétron

As peroxidases são encontradas no leite e em leucócitos, nas plaquetas e em outros tecidos envolvidos no metabolismo de eicosa-

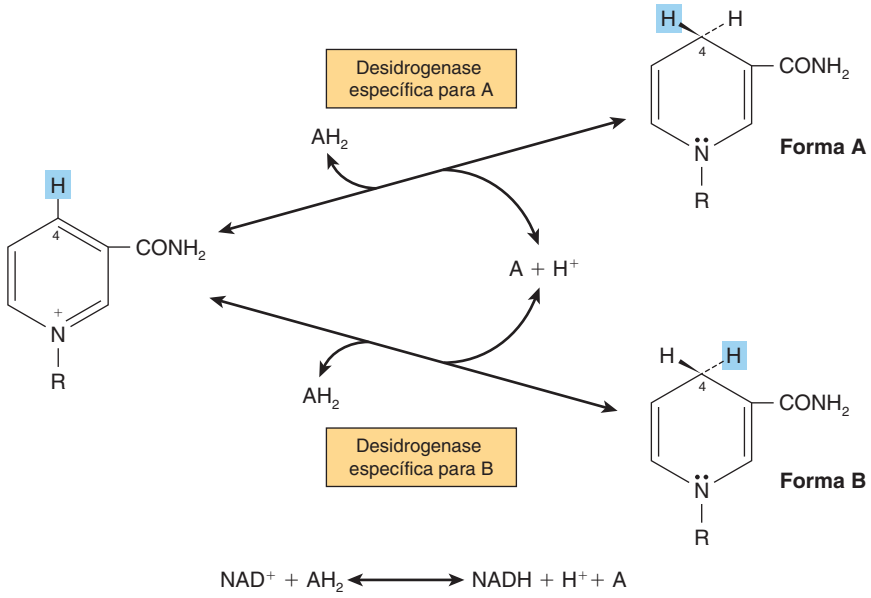


FIGURA 12-4 Mecanismo de oxidação e redução de coenzimas nicotinamida. Há estereoespecificidade sobre a posição 4 da nicotinamida quando ela é reduzida por um substrato AH_2. Um dos átomos de hidrogênio é removido do substrato como um núcleo de hidrogênio com dois elétrons (íon hidreto, H^-) e é transferido para a posição 4, onde ele pode ser ligado em uma forma A ou B, de acordo com a especificidade determinada pela desidrogenase particular que catalisa a reação. O hidrogênio remanescente do par de hidrogênios removido do substrato permanece livre como um íon hidrogênio.

noides (Capítulo 23). O grupamento prostético é o proto-heme. Na reação catalisada por peroxidase, o peróxido de hidrogênio é reduzido à custa de várias substâncias que atuam como aceptores de elétron, tais como o ascorbato, quinonas e citocromo *c*. A reação catalisada por peroxidase é complexa, porém a reação total é a seguinte:

$$H_2O_2 + AH_2 \xrightarrow{\text{PEROXIDASE}} 2H_2O + A$$

Nos eritrócitos e em outros tecidos, a enzima **glutationa peroxidase**, contendo **selênio** como um grupamento prostético, catalisa a destruição do H_2O_2 e hidroperóxidos lipídicos por meio da conversão da glutationa reduzida em sua forma oxidada, protegendo os lipídeos da membrana e a hemoglobina contra a oxidação pelos peróxidos (Capítulo 21).

A catalase emprega o peróxido de hidrogênio como doador e aceptor de elétron

A **catalase** é uma hemoproteína contendo quatro grupamentos heme. Além de possuir atividade de peroxidase, ela é capaz de usar uma molécula de H_2O_2 como substrato doador de elétron e outra molécula de H_2O_2 como oxidante ou aceptor de elétron.

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{CATALASE}} 2H_2O_2 + O_2$$

Sob a maior parte das condições *in vivo*, a atividade de peroxidase da catalase parece ser favorecida. A catalase é encontrada no sangue, na medula óssea, nas mucosas, nos rins e no fígado. Ela age para destruir o peróxido de hidrogênio formado pela ação das oxidases. Os **peroxissomos** são encontrados em muitos tecidos, inclusive no fígado. Eles são ricos em oxidases e em catalase. Dessa maneira, as enzimas que produzem H_2O_2 são agrupadas com a enzima que os clivam. Contudo, os sistemas de transporte de elétrons mitocondrial e microssomal, bem como a xantina-oxidase, devem ser considerados fontes adicionais de H_2O_2.

AS OXIGENASES CATALISAM A TRANSFERÊNCIA DIRETA E A INCORPORAÇÃO DO OXIGÊNIO EM UMA MOLÉCULA DE SUBSTRATO

As oxigenases estão relacionadas com a síntese ou degradação de muitos tipos diferentes de metabólitos. Elas catalisam a incorporação de oxigênio em uma molécula de substrato em duas etapas: (1) o oxigênio é ligado à enzima no sítio ativo e (2) o oxigênio ligado é reduzido ou transferido para o substrato. As oxigenases podem ser divididas em dois subgrupos, dioxigenases e mono-oxigenases.

As dioxigenases incorporam ambos os átomos de oxigênio em substrato

A reação básica catalisada por dioxigenases é mostrada abaixo:

$$A + O_2 \rightarrow AO_2$$

Os exemplos incluem as enzimas hepáticas, **homogentisato-dioxigenase** (oxidase) e **3-hidroxiantranilato-dioxigenase** (oxidase), que contêm ferro; e **L-triptofano-dioxigenase** (triptofano pirolase) (Capítulo 29), que emprega o heme.

As mono-oxigenases (oxidases de função mista, hidroxilases) incorporam apenas um átomo de oxigênio molecular no substrato

O outro átomo de oxigênio é reduzido à água, sendo necessário um doador de elétron adicional ou cossubstrato (Z) para esta finalidade:

$$A — H + O_2 + ZH_2 \rightarrow A — OH + H_2O + Z$$

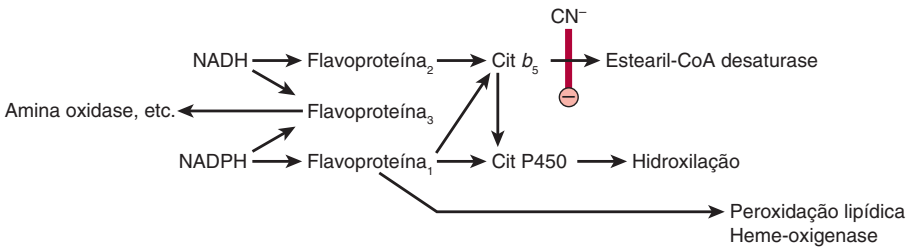


FIGURA 12-5 Cadeia de transporte de elétrons no retículo endoplasmático. O cianeto (CN^-) inibe a etapa indicada.

Os citocromos P450 são mono-oxigenases importantes para a destoxificação de muitas substâncias e para a hidroxilação de esteroides

Os **citocromos P450** constituem uma importante superfamília de mono-oxigenases portadoras de heme, sendo que >50 dessas enzimas foram encontradas no genoma humano. Esses citocromos localizam-se principalmente no retículo endoplasmático do fígado e dos intestinos, mas também são achados na mitocôndria em alguns tecidos. Tanto o NADH quanto o NADPH doam equivalentes de redução para a redução desses citocromos (**Figura 12-5**), os quais, por sua vez, são oxidados como o **ciclo da hidroxilase** (**Figura 12-6**). No retículo endoplasmático do fígado, os citocromos são encontrados em conjunto com o **citocromo b_5** e possuem um papel importante no metabolismo e na destoxificação de substâncias; eles são responsáveis por aproximadamente 75% da modificação e degradação de substâncias que ocorrem no organismo. A velocidade de destoxificação de muitas substâncias medicinais por citocromos P450 determina a duração de suas ações. Benzpireno, aminopirina, anilina, morfina e benzfetamina são hidroxilados, aumentando sua solubilidade e sua excreção. Muitas substâncias, como o fenobarbital, possuem a capacidade de induzir a síntese de citocromos P450.

Os sistemas citocromo P450 mitocondriais são encontrados nos tecidos esteroidogênicos, como o córtex suprarrenal, os testículos, o ovário e a placenta, e são relacionados com a biossíntese dos hormônios esteroides a partir do colesterol (hidroxilação em C_{22} e C_{20} na clivagem da cadeia lateral e nas posições 11β e 18). Além disso, os sistemas renais que catalisam a 1α-hidroxilação e a 24-hidroxilação do 25-hidroxicolecalciferol no metabolismo da vitamina D – e a colesterol 7α-hidroxilase e a esterol 27-hidroxilase envolvidas na biossíntese de ácido biliar a partir do colesterol no fígado (Capítulo 26) – são enzimas P450.

A SUPERÓXIDO-DISMUTASE PROTEGE OS ORGANISMOS AERÓBIOS CONTRA A INTOXICAÇÃO POR OXIGÊNIO

A transferência de um único elétron para o O_2 gera o **radical livre ânion superóxido (O_2^-)**, o qual origina reações de cadeia de

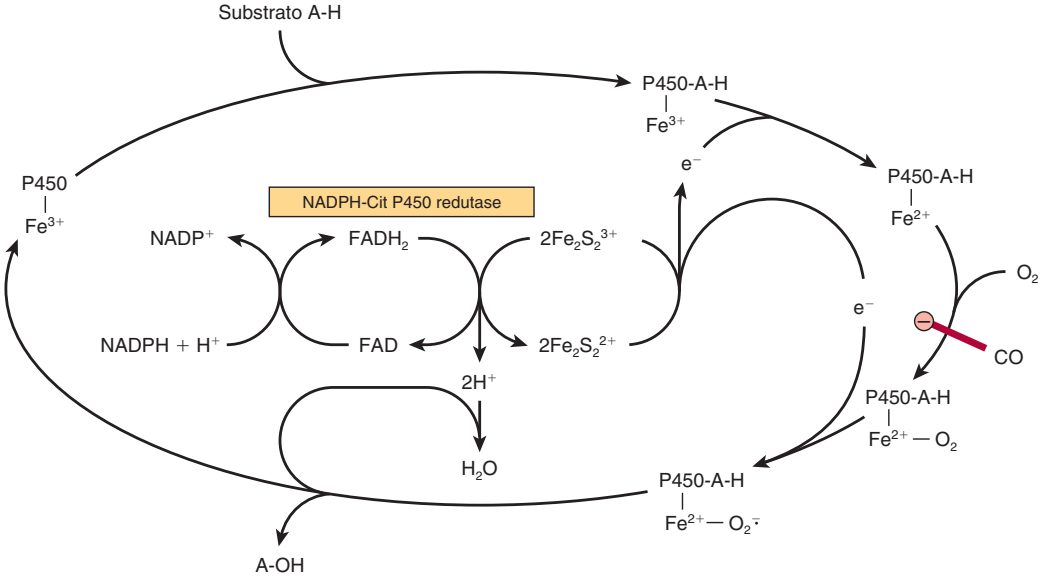


FIGURA 12-6 Ciclo da citocromo P450 hidroxilase. O sistema mostrado é típico das esteroide hidroxilases do córtex da suprarrenal. A citocromo P450 hidroxilase microssomal hepática não requer a proteína de ferro-enxofre Fe_2S_2. O monóxido de carbono (CO) inibe a etapa indicada.

radical livre (Capítulo 15), amplificando seus efeitos destrutivos. A facilidade com que o superóxido pode ser formado a partir do oxigênio nos tecidos e a ocorrência da **superóxido-dismutase**, a enzima responsável por sua remoção em todos os organismos aeróbios (embora não em anaeróbios obrigatórios), indicam que a toxicidade potencial do oxigênio se deve à sua conversão em superóxido.

O superóxido é formado quando as flavinas reduzidas – presentes, por exemplo, na xantina oxidase – são reoxidadas de modo univalente pelo oxigênio molecular:

$$\text{Enz} - \text{Flavina} - \text{H}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{Enz} - \text{Flavina} - \text{H} + \text{O}_2^{\cdot -} + \text{H}^+$$

O superóxido pode reduzir o citocromo *c* oxidado

$$\text{O}_2^{\cdot -} + \text{Cit } c\ (\text{Fe}^{3+}) \rightarrow \text{O}_2 + \text{Cit } c\ (\text{Fe}^{2+})$$

ou ser removido pela superóxido dismutase.

Nessa reação, o superóxido age tanto como oxidante quanto como redutor. Dessa forma, a superóxido dismutase protege os organismos aeróbios contra os efeitos deletérios potenciais do superóxido. A enzima ocorre em todos os principais tecidos aeróbios nas mitocôndrias e no citosol. Embora a exposição de animais a uma atmosfera de oxigênio a 100% provoque um aumento adaptativo na superóxido dismutase, principalmente nos pulmões, a exposição prolongada causa lesão pulmonar e morte. Os antioxidantes, tais como α-tocoferol (vitamina E), atuam como os depuradores dos radicais livres e reduzem a toxicidade do oxigênio (Capítulo 44).

RESUMO

- Nos sistemas biológicos, assim como nos sistemas químicos, a oxidação (perda de elétrons) sempre é acompanhada por redução de um aceptor de elétron.
- As oxidorredutases possuem uma gama de funções no metabolismo; as oxidases e as desidrogenases desempenham papéis importantes na respiração; as hidroperoxidases protegem o organismo contra a lesão pelos radicais livres; e as oxigenases medeiam a hidroxilação de substâncias e esteroides.
- Os tecidos são protegidos contra a toxicidade do oxigênio causada pelo radical livre superóxido pela enzima superóxido dismutase específica.

REFERÊNCIAS

Babcock GT, Wikstrom M: Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. Nature 1992;356:301.

Coon MJ: Cytochrome P450: Nature's most versatile biological catalyst. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2005;4:1.

Harris DA: *Bioenergetics at a Glance: An Illustrated Introduction*. Blackwell Publishing, 1995.

Johnson F, Giulivi C: Superoxide dismutases and their impact upon human health. Mol Aspects Med 2005;26.

Nicholls DG, Ferguson SJ: *Bioenergetics3*. Academic Press, London 2002.

Raha S, Robinson BH: Mitochondria, oxygen free radicals, disease and aging. Trends Biochem Sci 2000;25:502.

CAPÍTULO

13

A Cadeia Respiratória e a Fosforilação Oxidativa

Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e
Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever a estrutura de dupla membrana da mitocôndria e indicar a localização de várias enzimas.
- Considerar que a energia decorrente da oxidação de substratos combustíveis (lipídeos, carboidratos, aminoácidos) é quase totalmente liberada nas mitocôndrias como equivalentes de redução, os quais são passados por um processo denominado transporte de elétrons por meio de uma série de transportadores ou complexos redox embebidos na membrana interna da mitocôndria conhecida como a cadeia respiratória, até que eles finalmente reagem com o oxigênio para formar água.
- Caracterizar os quatro complexos proteicos envolvidos na transferência de elétrons por meio da cadeia respiratória e explicar os papéis das flavoproteínas, proteínas ferro-enxofre e coenzima Q.
- Compreender como a coenzima Q aceita os elétrons do NADH por meio do Complexo I e do $FADH_2$ por meio do Complexo II.
- Indicar como os elétrons são transmitidos da coenzima Q reduzida para o citocromo *c* por meio do Complexo III no ciclo Q.
- Explicar o processo pelo qual o citocromo *c* reduzido é oxidado e o oxigênio é reduzido em água por meio do Complexo IV.
- Entender como o transporte de elétrons por meio da cadeia respiratória gera um gradiente de prótons pela membrana mitocondrial interna, levando à formação de uma força próton-motora que gera ATP por meio do processo da fosforilação oxidativa.
- Descrever a estrutura da enzima ATP sintetase e explicar como ela atua como um motor rotatório para produzir ATP a partir do ADP e Pi.
- Identificar as cinco condições que controlam a velocidade da respiração nas mitocôndrias e compreender que a oxidação de equivalentes de redução por meio da cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa estão firmemente atreladas em muitas circunstâncias, de tal maneira que um não pode prosseguir a menos que o outro esteja funcionando.
- Indicar os exemplos de venenos comuns que bloqueiam a respiração ou a fosforilação oxidativa e identificar seus sítios de ação.
- Demonstrar, com exemplos, como os desacopladores podem atuar como venenos ao dissociar a oxidação por meio da cadeia respiratória da fosforilação oxidativa, porém também podem ter um papel fisiológico na geração do calor corporal.
- Explicar o papel dos transportadores de troca presentes na membrana interna da mitocôndria na permissão da travessia de íons e metabólitos, enquanto preservam o equilíbrio eletroquímico e o osmótico.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Os organismos aeróbios são capazes de capturar uma proporção muito maior da energia livre disponível dos substratos respiratórios que os organismos anaeróbios. Grande parte disso acontece dentro das mitocôndrias, as quais foram denominadas de "geradores de energia" da célula. A respiração está acoplada à produção do intermediário de alta energia, o ATP, por meio da **fosforilação oxidativa**. Inúmeros medicamentos (p. ex., **amobarbital**) e venenos (p. ex., **cianeto, monóxido de carbono**) inibem a fosforilação oxidativa, comumente com consequências fatais. Foram relatados vários defeitos hereditários das mitocôndrias envolvendo os componentes da cadeia respiratória e da fosforilação oxidativa. Os pacientes apresentam **miopatia** e **encefalopatia**, manifestando, com frequência, **acidose lática**.

AS ENZIMAS ESPECÍFICAS ATUAM COMO MARCADORES DOS COMPARTIMENTOS SEPARADOS PELAS MEMBRANAS MITOCONDRIAIS

As mitocôndrias possuem uma **membrana externa**, a qual é permeável à maioria dos metabólitos, e uma **membrana interna**, a qual exibe permeabilidade seletiva, envolvendo uma **matriz** (**Figura 13-1**). A membrana externa caracteriza-se pela presença de diversas enzimas, incluindo a **acil-CoA sintetase** e a **glicerolfosfato aciltransferase**. A **adenilil-quinase** e a **creatina-quinase** são encontradas no **espaço intermembranas**. O fosfolipídeo **cardiolipina** fica concentrado na membrana interna, junto às enzimas da **cadeia respiratória,** à **ATP-sintase** e a diversos **transportadores de membrana.**

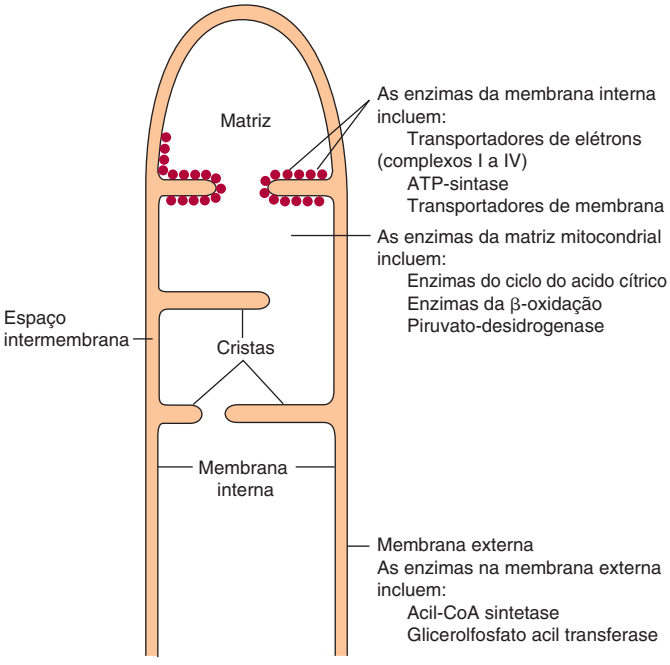


FIGURA 13-1 Estrutura das membranas mitocondriais. Observe que a membrana interna contém muitas pregas ou cristas.

A CADEIA RESPIRATÓRIA OXIDA OS EQUIVALENTES DE REDUÇÃO E ATUA, COMO BOMBA DE PRÓTONS

Grande parte da energia liberada durante a oxidação de carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos é disponibilizada dentro das mitocôndrias como equivalentes de redução (-H ou elétrons) (**Figura 13-2**). Observe que as enzimas do ciclo do ácido cítrico e a β-oxidação (Capítulos 22 e 17) estão contidas nas mitocôndrias, juntamente à cadeia respiratória, a qual coleta e transporta os equivalentes de redução, direcionando-os para sua reação final com o oxigênio para formar água, e com a maquinaria para a fosforilação oxidativa, o processo pelo qual a energia livre liberada é aprisionada como **fosfato de alta energia**.

Os componentes da cadeia respiratória estão contidos em quatro grandes complexos proteicos embebidos na membrana mitocondrial interna

Os elétrons fluem pela cadeia respiratória por meio de um espectro redox de 1,1 V do NAD^+/NADH para $O_2/2H_2O$ (Tabela 12-1), passando por três grandes complexos proteicos: **NADH-Q oxidorredutase** (**Complexo I**), onde os elétrons são transferidos do NADH para a **coenzima Q** (**Q**) (também chamada de **ubiquinona**); **Q-citocromo *c*-oxidorredutase** (**Complexo III**), que passa os elétrons adiante para o **citocromo *c***; **e citocromo *c*-oxidase** (**Complexo IV**), o qual completa a cadeia, passando os elétrons para o O_2, o reduzindo para H_2O (**Figura 13-3**). Alguns substratos com potenciais redox mais positivos que o NAD^+/NADH (p. ex., succinato) passam os elétrons para o Q por meio de um quarto complexo, **succinato-Q redutase** (**Complexo II**), em lugar do Complexo I. Os quatro complexos estão embebidos na membrana mitocondrial interna, mas Q e o citocromo *c* são móveis. Q difunde-se rapidamente dentro da membrana, enquanto o citocromo *c* é uma proteína solúvel. O fluxo de elétrons pelos Complexos I, III e IV resulta no bombeamento de prótons a partir da matriz por meio da membrana mitocondrial interna para dentro do espaço intermembrana (Figura 13-7).

As flavoproteínas e as proteínas ferro-enxofre (Fe-S) são componentes dos complexos da cadeia respiratória

As **flavoproteínas** (Capítulo 12) são importantes componentes dos Complexos I e II. As flavinas nucleotídeos (FMN ou FAD) oxidadas podem ser reduzidas nas reações que envolvem a transferência de dois elétrons (para formar $FMNH_2$ OU $FADH_2$), mas também podem aceitar um elétron para formar uma semiquinona (Figura 12-2). As **proteínas ferro-enxofre**

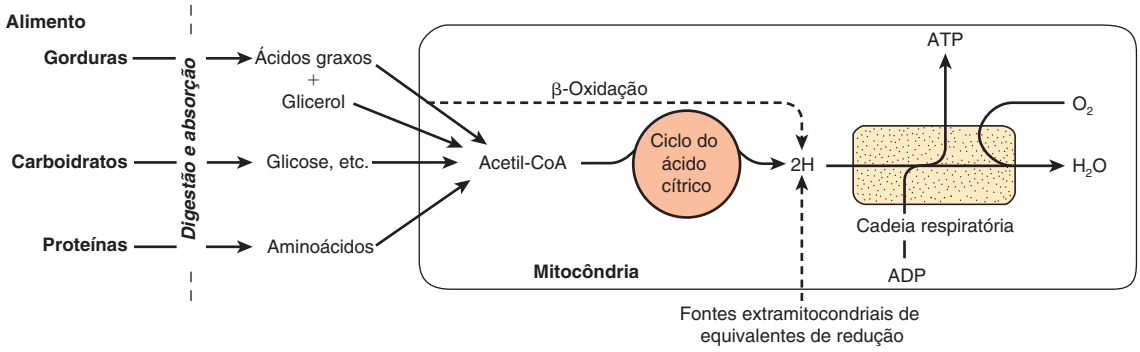


FIGURA 13-2 Papel da cadeia respiratória das mitocôndrias na conversão da energia alimentar em ATP. A oxidação dos principais nutrientes leva à produção de equivalentes de redução (2H), que são coletados pela cadeia respiratória para oxidação e produção concomitante de ATP.

(**proteínas sem ferro heme, Fe-S**) são encontradas nos Complexos I, II e III. Podem conter um, dois ou quatro átomos de Fe ligados a átomos de enxofre inorgânico e/ou por meio de grupamentos cisteína-SH à proteína (**Figura 13-4**). O Fe-S participa nas reações de transferência de um único elétron, nas quais um átomo de Fe sofre oxidorredução entre Fe^{2+} e Fe^{3+}.

A Q aceita elétrons por meio dos Complexos I e II

A NADH-Q oxidorredutase, ou Complexo I, é uma grande proteína com múltiplas subunidades em forma de L que catalisa a transferência de elétron do NADH para a Q, associada à transferência de quatro H^+ pela membrana:

$$NADH + Q + 5H^+_{\text{matriz}} \rightarrow NA\,D + QH_2 + 4H^+_{\text{espaço intermembrana}}$$

A princípio, os elétrons são transferidos do NADH para a FMN, depois para uma série de centros Fe-S e, por fim, para a Q (**Figura 13-5**). No Complexo II (succinato-Q redutase), o $FADH_2$ é formado durante a conversão do succinato em fumarato no ciclo do ácido cítrico (Figura 17-3) e os elétrons são então transferidos por meio de diversos centros Fe-S para a Q (Figura 13-5). O glicerol-3-fosfato (produzido na clivagem de triacilgliceróis ou a partir da glicólise, Figura 18-2) e a acil-CoA também passam elétrons para o Q por vias diferentes, envolvendo as flavoproteínas (Figura 13-5).

O ciclo Q acopla a transferência de elétrons ao transporte de prótons no Complexo III

Os elétrons são passados do QH_2 para o citocromo *c* por meio do Complexo III (Q-citocromo *c*-oxidorredutase):

$$QH_2 + 2Cit\,c_{\text{oxidado}} + 2H^+_{\text{matriz}} \rightarrow Q + 2Cit\,c_{\text{reduzido}} + 4H^+_{\text{espaço intermembrana}}$$

Acredita-se que o processo envolve os **citocromos c_1, b_1 e b_H e um Fe-S Rieske** (um Fe-S incomum em que um dos átomos de

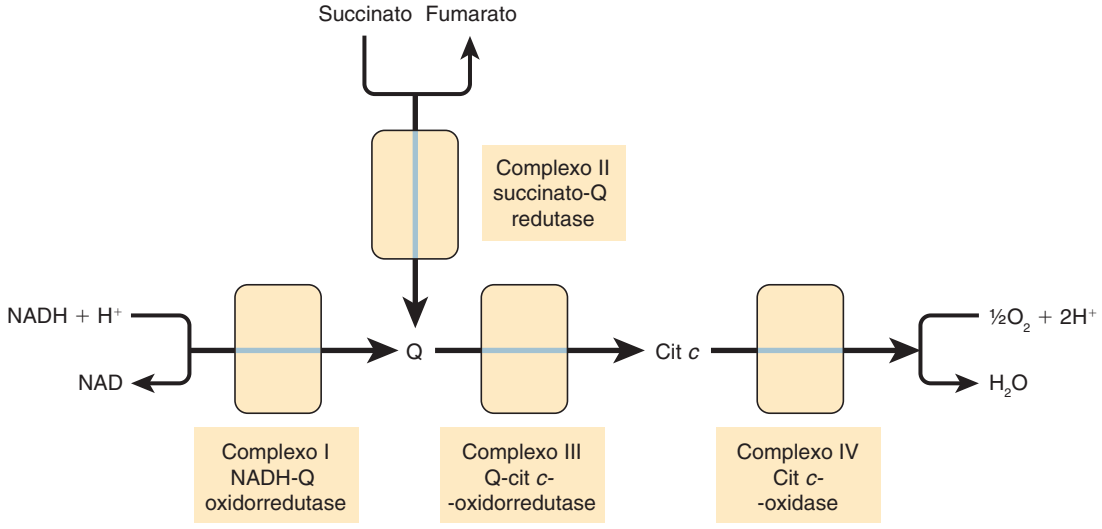


FIGURA 13-3 Visão geral do fluxo de elétrons pela cadeia respiratória. (cit, citocromo; Q, coenzima Q ou ubiquinona.)

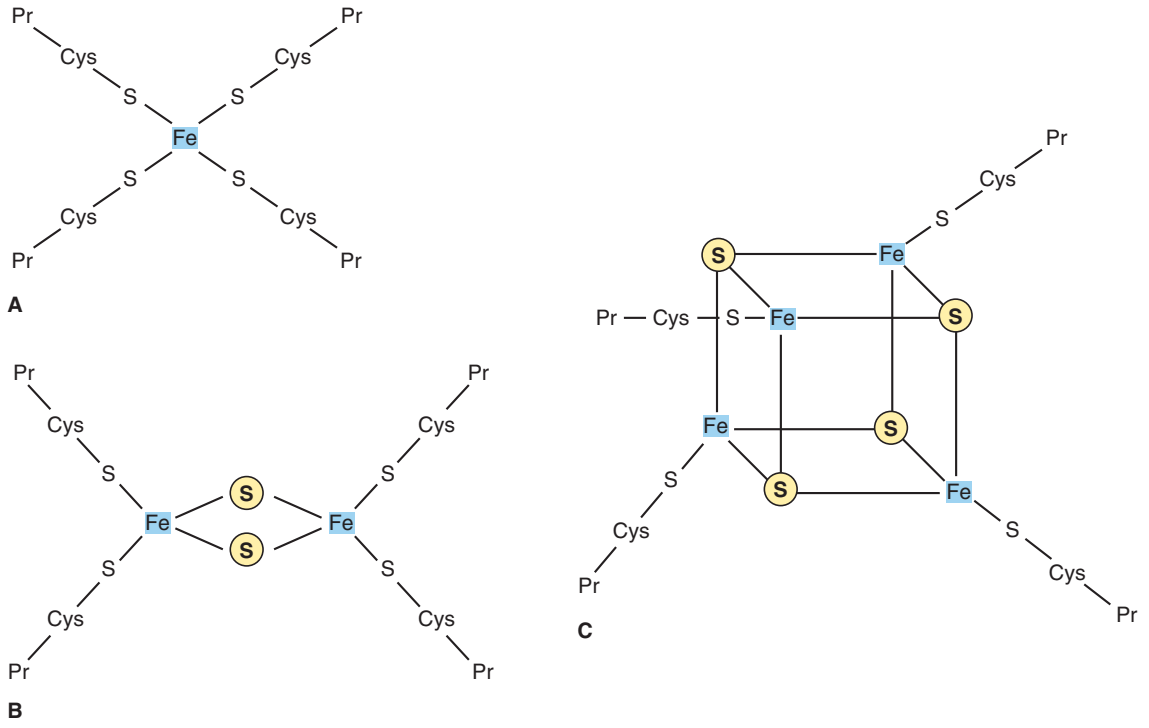


FIGURA 13-4 Proteínas ferro-enxofre (Fe-S). (A) O Fe-S mais simples com um Fe ligado a quatro cisteínas. **(B)** Centro 2Fe-2S. **(C)** Centro 4Fe-4S. (Cys, cisteína; Pr, apoproteína; (S) Enxofre inorgânico.)

Fe está ligado a dois resíduos de histidina em vez de dois resíduos de cisteína) (Figura 13-5), sendo conhecido como o **ciclo Q** (**Figura 13-6**). A Q pode existir em três formas: a quinona oxidada, o quinol reduzido ou a semiquinona (Figura 13-6). A semiquinona é formada de modo transitório durante o ciclo, resultando, em uma das ocasiões, na oxidação do $2QH_2$ em Q, liberando $4H^+$ no espaço intermembrana, e na redução de um Q a QH_2, causando a captação de 2 H^+ a partir da matriz (Figura 13-6). Observe que, enquanto Q transporta dois elétrons, os citocromos carregam apenas um e, assim sendo, a oxidação de um

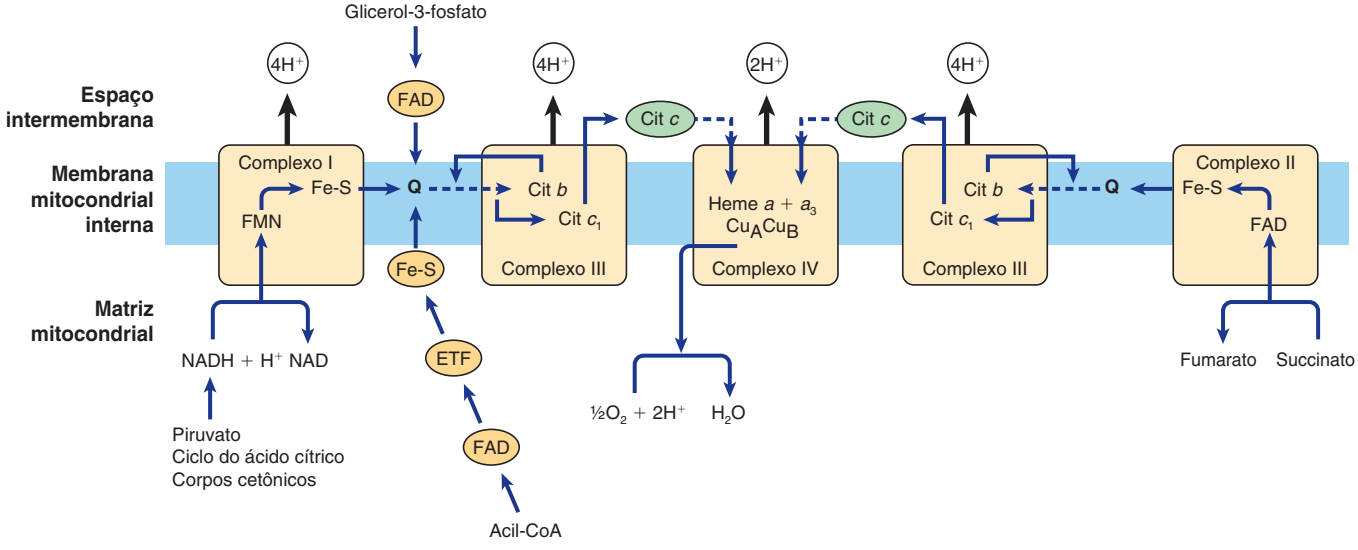
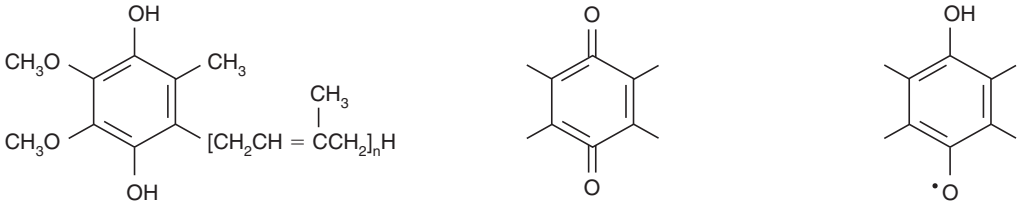


FIGURA 13-5 Fluxo de elétrons pelos complexos da cadeia respiratória, mostrando os pontos de entrada para os equivalentes de redução a partir de substratos importantes. Q e cit *c* são componentes móveis do sistema, conforme indicado pelas setas tracejadas. O fluxo pelo Complexo III (o ciclo Q) é mostrado em maiores detalhes na Figura 13-6. (ETF, flavoproteína de transferência de elétron; Fe-S proteína ferro-enxofre; cit, citocromo; Q, coenzima Q ou ubiquinona.)



QH_2: Forma reduzida (quinol) (QH_2) **Q:** Forma totalmente oxidada (quinona) **$^{\bullet}Q^{-}$:** Forma de semiquinona (radical livre)

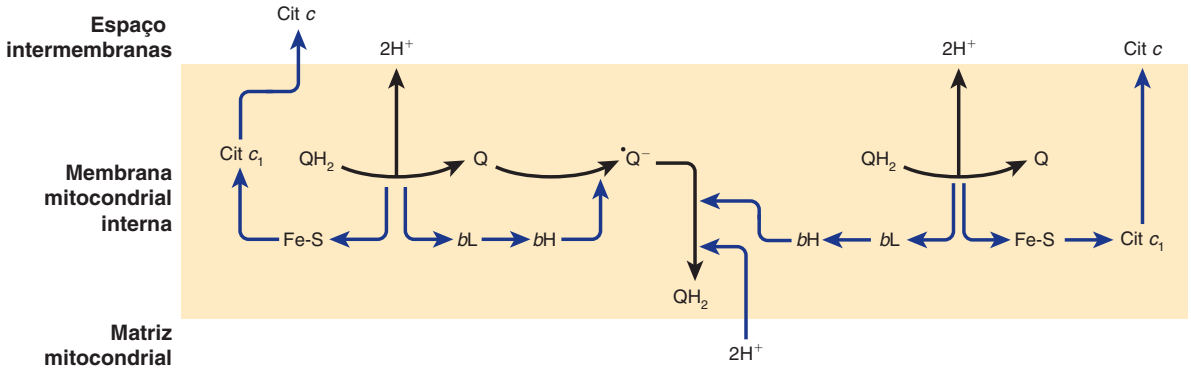


FIGURA 13-6 O ciclo Q. Durante a oxidação de QH_2 para Q, um elétron é doado para o cit *c* por meio de Fe-S Rieske e de um cit *c*, e o segundo para uma Q para formar a semiquinona por meio do cit b_L e cit b_H, com 2 H^+ sendo liberados para dentro do espaço intermembranas. Então, um processo similar acontece com um segundo QH_2, mas, neste caso, o segundo elétron é doado para a semiquinona, reduzindo-a para QH_2, sendo que $2H^+$ são captados a partir da matriz. (cit, citocromo; Fe-S, proteína ferro-enxofre; Q, coenzima Q ou ubiquinona.)

QH_2 está atrelada à redução de duas moléculas de citocromo *c* por meio do ciclo Q.

O oxigênio molecular é reduzido à água por meio do Complexo IV

O citocromo *c* reduzido é oxidado pelo Complexo IV (citocromo *c* oxidase), com a redução concomitante do O_2 a duas moléculas de água:

$$4\text{Cit } c_{\text{reduzido}} + O_2 + 8H^+_{\text{matriz}} \rightarrow 4\text{Cit } c_{\text{oxidado}} + 2H_2O + 4H^+_{\text{espaço intermembrana}}$$

Essa transferência de quatro elétrons do citocromo *c* para o O_2 envolve **dois grupamentos heme**, ***a*** **e** a_3, e **Cu** (Figura 13-5). Os elétrons são inicialmente passados para um centro de Cu (Cu_A), o qual contém 2 átomos de Cu ligados a dois grupamentos cisteína-SH proteicos (assemelhando-se a um Fe-S), depois em sequência ao heme *a*, heme a_3, um segundo centro de Cu, Cu_B – o qual está ligado ao heme a_3 – e, por fim, ao O_2. Dos oito H^+ removidos da matriz, quatro são empregados para formar duas moléculas de água e quatro são bombeados para dentro do espaço intermembrana. Dessa maneira, para cada par de elétrons que continuam na cadeia desde o NADH ou $FADH_2$, $2H^+$ são bombeados através da membrana pelo Complexo IV. O O_2 permanece firmemente ligado ao Complexo IV até que ele seja totalmente reduzido, e isso minimiza a liberação de intermediários potencialmente lesivos, como ânion superóxido ou peróxido, os quais são formados quando o O_2 aceita um ou dois elétrons, respectivamente (Capítulo 12).

O TRANSPORTE DE ELÉTRONS PELA CADEIA RESPIRATÓRIA CRIA UM GRADIENTE DE PRÓTONS, O QUAL DIRECIONA A SÍNTESE DO ATP

O fluxo dos elétrons pela cadeia respiratória gera ATP por meio do processo de **fosforilação oxidativa**. **A teoria quimiosmótica**, proposta por Peter Mitchell em 1961, postula que os dois processos estão ligados por um gradiente de prótons pela membrana mitocondrial interna de tal maneira que a **força motora de prótons** causada pela diferença do potencial eletroquímico (negativa no lado da matriz) direciona o mecanismo da síntese de ATP. Conforme observado, os Complexos I, III e IV atuam como **bombas de prótons**. Como a membrana mitocondrial interna é impermeável aos íons em geral e principalmente aos prótons, estes se acumulam no espaço intermembrana, criando a força motora de prótons predita pela teoria quimiostática.

Uma ATP sintetase localizada na membrana funciona como um motor rotatório para formar o ATP

A força motora de prótons ativa uma **ATP sintetase** localizada na membrana que forma o ATP na presença de P_i + ADP. A ATP sintetase está embebida na membrana interna, juntamente aos complexos da cadeia respiratória (**Figura 13-7**). Diversas subunidades da proteína assumem uma forma semelhante a uma bola, dispostas ao redor de um eixo conhecido como F_1, o qual se

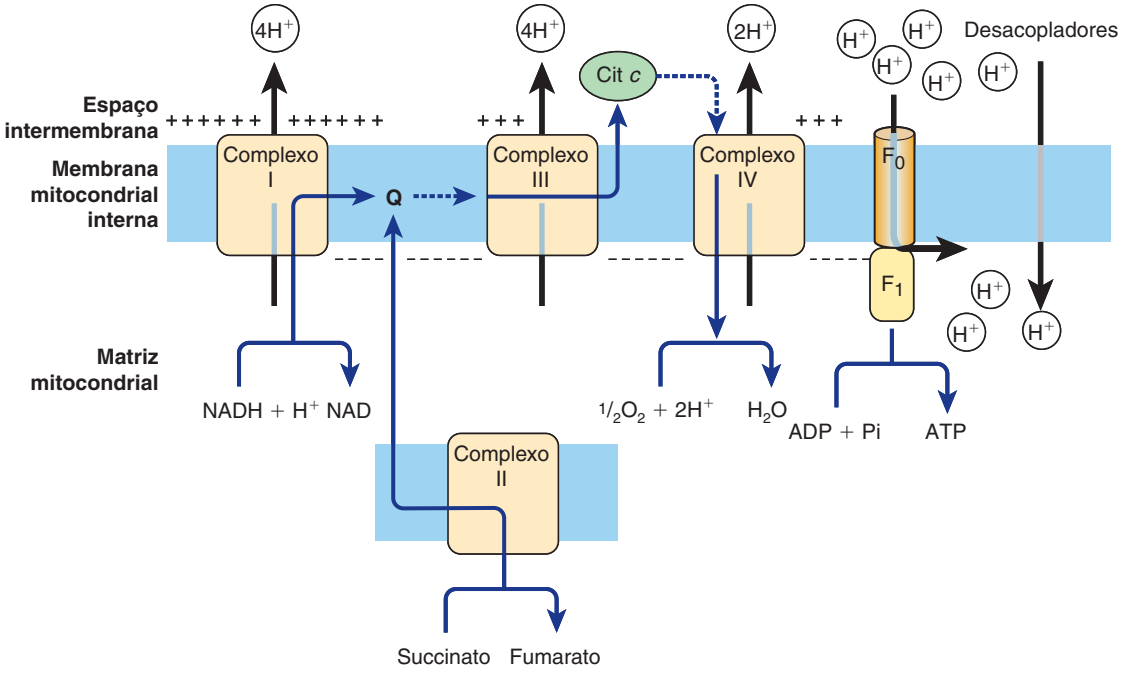


FIGURA 13-7 A teoria quimiosmótica da fosforilação oxidativa. Os Complexos I, III e IV agem como bombas de próton, criando um gradiente de prótons através da membrana, o qual é negativo no lado da matriz. A força motora de prótons gerada direciona a síntese do ATP à medida que os prótons fluem de volta para a matriz por meio da enzima ATP sintetase (ver Figura 13-8). Os desacopladores aumentam a permeabilidade da membrana aos íons, colapsando o gradiente de prótons ao permitir que o H^+ atravesse sem precisar fazê-lo por meio da ATP sintetase e, desta maneira, desacopla o fluxo de elétrons pelos complexos respiratórios a partir da ATP sintetase. (cit, citocromo; Q, coenzima Q ou ubiquinona.)

projeta para dentro da matriz e contém o mecanismo de fosforilação (**Figura 13-8**). O F_1 está ligado a uma proteína complexa de membrana conhecida como F_0, a qual também consiste em diversas subunidades proteicas. A F_0 afasta a membrana e forma um canal de prótons. O fluxo de prótons pela F_0 provoca sua rotação, direcionando a produção de ATP no complexo F_1 (Figuras 13-7 e 13-8). Acredita-se que isto ocorre por meio de um **mecanismo de troca de ligação**, no qual a conformação das subunidades β

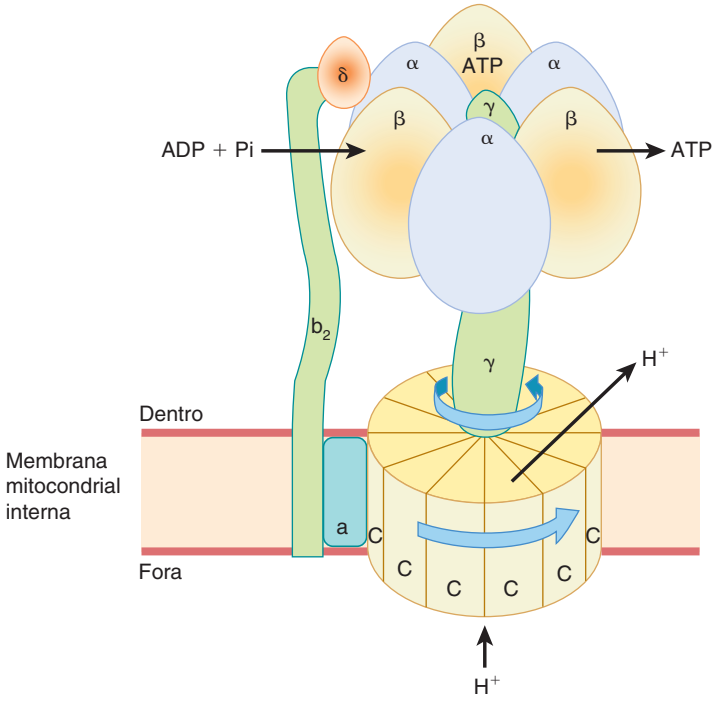


FIGURA 13-8 Mecanismo de produção de ATP por meio da ATP-sintase. O complexo enzimático consiste em um subcomplexo F_0, o qual é um disco de subunidades de proteína "C". Este se liga a uma subunidade γ na forma de um "eixo curvado". Os prótons que atravessam o disco de unidades "C" causam a rotação do disco e da subunidade γ acoplada. A subunidade γ adapta-se dentro do subcomplexo F_1 de três subunidades α e três subunidades β, que estão fixados à membrana e não rotam. O ADP e o P_i são captados sequencialmente pelas subunidades β para formar o ATP, o qual é expulso à medida que a subunidade γ rotatória espreme cada subunidade β por vez e muda sua conformação. Desta maneira, três moléculas de ATP são produzidas a cada revolução. A fim de maior clareza, nem todas as subunidades que foram identificadas são mostradas – por exemplo, o "eixo" também contém uma subunidade ε.

no F_1 é modificada à medida que o eixo rota daquela que se liga firmemente ao ATP até aquela que libera o ATP e se liga ao ADP e P_i, de tal maneira que o próximo ATP possa ser formado. Os Complexos I e III translocam, cada um, quatro prótons e o Complexo IV transloca dois.

A CADEIA RESPIRATÓRIA FORNECE A MAIOR PARTE DA ENERGIA CAPTURADA DURANTE O CATABOLISMO

O ADP captura, na forma de fosfato de alta energia, uma proporção significativa da energia livre liberada por processos catabólicos. O ATP resultante é chamado de a "**moeda energética**" da célula, porque ela transmite a energia livre para direcionar aqueles processos que requerem energia (Figura 11-6).

Existe uma captura direta global de dois grupamentos de fosfato de alta energia nas reações glicolíticas (Tabela 18-1). Outros dois fosfatos de alta energia por mol de glicose são capturados no ciclo do ácido cítrico durante a conversão da succinil CoA em succinato. Todas essas fosforilações ocorrem no **nível de substrato**. Para cada mol de substrato oxidado por meio dos Complexos I, III e IV na cadeia respiratória (i.e., pelo NADH), são formados 2,5 mol de ATP por 0,5 mol de O_2 consumido; isto é, a razão P:O = 2,5 (Figura 13-7). Por outro lado, quando 1 mol de substrato (p. ex., succinato ou 3-fosfoglicerato) é oxidado por meio dos Complexos II, III e IV, apenas 1,5 mol de ATP é formado; isto é, P:O = 1,5. Estas reações são conhecidas como a **fosforilação oxidativa no nível da cadeia respiratória**. Considerando esses valores, pode-se estimar que quase 90% dos fosfatos de alta energia produzidos a partir da oxidação completa de 1 mol de glicose são obtidos por meio da fosforilação oxidativa contida na cadeia respiratória (Tabela 18-1).

O controle respiratório garante um suprimento constante de ATP

A velocidade da respiração da mitocôndria pode ser controlada por meio da disponibilidade do ADP. Isso acontece porque a oxidação e a fosforilação estão **firmemente interligadas**; isto é, a oxidação não pode continuar por meio da cadeia respiratória sem a concomitante fosforilação do ADP. A **Tabela 13-1** mostra as cinco condições que controlam a velocidade da respiração na mitocôndria. Muitas células em estado de repouso se encontram no **estado 4**, sendo a respiração controlada pela disponibilidade de ADP. Quando se realiza o trabalho, o ATP é convertido em ADP, possibilitando que ocorra mais respiração, o que, por sua vez, repõe a reserva de ATP. Sob determinadas condições, a concentração de fosfato inorgânico também pode afetar a velocidade de funcionamento da cadeia respiratória. À medida que a respiração se intensifica (como ocorre no exercício), a célula aproxima-se do **estado 3 ou 5**, quando a capacidade da cadeia respiratória se torna saturada ou a PO_2 diminui abaixo do K_m para o heme a_3. Também há a possibilidade de que o transportador de ADP/ATP, o qual facilita a entrada do ADP citosólico e a saída do ATP da mitocôndria, se transforme no limitador da velocidade.

TABELA 13-1 Estados do controle respiratório

	Condições limitadoras da velocidade da respiração
Estado 1	Disponibilidade de ADP e substrato
Estado 2	Disponibilidade apenas de substrato
Estado 3	A capacidade da própria cadeia respiratória, quando todos os substratos e componentes estão presentes em quantidades saturantes
Estado 4	Disponibilidade apenas de ADP
Estado 5	Disponibilidade apenas de oxigênio

Assim, a maneira pela qual os processos oxidativos biológicos permitem que a energia livre decorrente da oxidação dos alimentos seja disponibilizada e utilizada é gradual, eficiente e controlada – em vez de explosiva, ineficiente e descontrolada, como em muitos processos não biológicos. A energia livre restante que não é capturada como fosfato de alta energia é liberada como **calor**. Essa energia não precisa ser considerada "perdida", pois ela assegura que o sistema respiratório como um todo seja suficientemente exergônico para ser tirado do equilíbrio, possibilitando o fluxo unidirecional contínuo e a provisão constante de ATP. Ela também contribui para a manutenção da temperatura corporal.

MUITOS VENENOS INIBEM A CADEIA RESPIRATÓRIA

Grande parte das informações a respeito da cadeia respiratória foi obtida por meio do uso de inibidores e, em contrapartida, isso gerou o conhecimento sobre o mecanismo de ação de diversos venenos (**Figura 13-9**). Eles podem ser classificados como inibidores da cadeia respiratória, inibidores da fosforilação oxidativa ou desacopladores da fosforilação oxidativa.

Os **barbitúricos**, como o amobarbital, inibem o transporte de elétrons por meio do Complexo I ao bloquear a transferência do Fe-S para o Q. Na dose suficiente, eles são fatais *in vivo*. A **antimicina A** e o **dimercaprol** inibem a cadeia respiratória no Complexo III. Os venenos clássicos **H_2S**, **monóxido de carbono** e **cianeto** inibem o Complexo IV e, por conseguinte, podem cessar totalmente a respiração. O **malonato** é um inibidor competitivo do Complexo II.

O **atractilosídeo** impossibilita a fosforilação oxidativa ao inibir o transportador de ADP para dentro e de ATP para fora da mitocôndria (**Figura 13-10**). O antibiótico **oligomicina** impede completamente a oxidação e a fosforilação ao bloquear o fluxo de prótons por meio da ATP-sintase (Figura 13-9).

Os **desacopladores** dissociam a oxidação da fosforilação na cadeia respiratória (Figura 13-7). Esses compostos são tóxicos *in vivo*, tornando a respiração descontrolada, pois a velocidade não é mais limitada pela concentração de ADP ou de P_i. O desacoplador que tem sido utilizado com maior frequência é o **2,4-dinitrofenol**, porém outros compostos atuam de maneira similar. A **termogenina** (**ou a proteína desacopladora**) é um desacoplador fisiológico encontrado no tecido adiposo marrom que funciona para gerar o calor corporal, principalmente para o recém-nascido e durante a hibernação em animais (Capítulo 25).

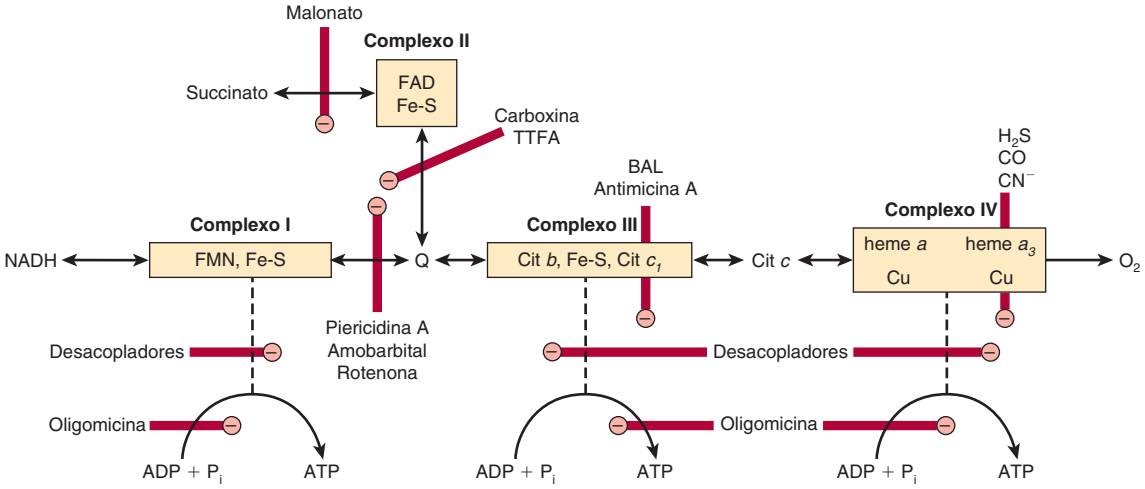


FIGURA 13-9 Sítios de inibição (⊖) da cadeia respiratória por medicamentos, substâncias químicas e antibióticos específicos. (BAL, dimercaprol; TTFA, um agente quelante do Fe. As outras abreviaturas são idênticas às da Figura 13-5.)

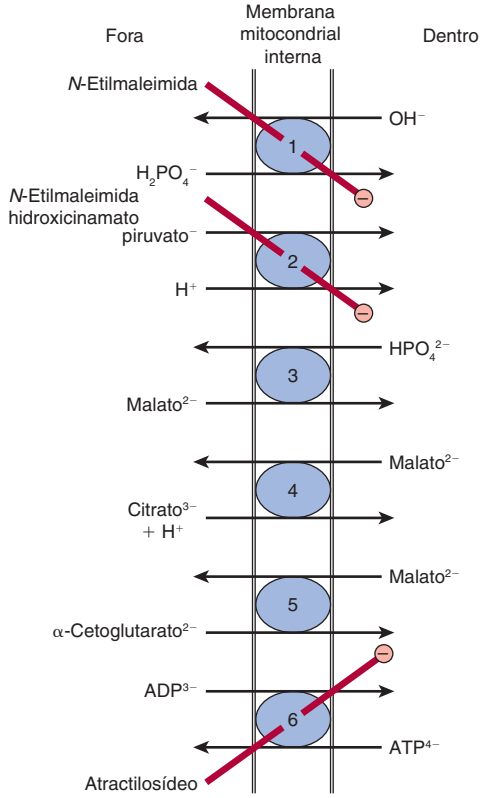


FIGURA 13-10 Sistemas transportadores na membrana mitocondrial interna. (1) Transportador de fosfato, (2) simporte de piruvato, (3) transportador de dicarboxilato, (4) transportador de tricarboxilato, (5) transportador de α-cetoglutarato, (6) transportador de adenina nucleotídeo. *N*-etilmaleimida, hidroxicinamato e atractilosídeo inibem (⊖) os sistemas indicados. Também presentes (mas não mostrados) estão os sistemas transportadores para glutamato/aspartato (Figura 13-13), glutamina, ornitina, aminoácidos neutros e carnitina (Figura 22-1).

A TEORIA QUIMIOSMÓTICA PODE CONTRIBUIR PARA O CONTROLE RESPIRATÓRIO E PARA A AÇÃO DOS DESACOPLADORES

Uma vez estabelecida como um resultado da translocação de prótons, a diferença de potencial eletroquímico pela membrana inibe o transporte adicional de equivalentes de redução pela cadeia respiratória, a menos que descarregado por translocação reversa de prótons pela membrana por meio da ATP-sintase. Por sua vez, isto depende da disponibilidade de ADP e P_i.

Os desacopladores (p. ex., dinitrofenol) são anfipáticos (Capítulo 15) e aumentam a permeabilidade da membrana mitocondrial interna lipoide aos prótons, reduzindo, assim, o potencial eletroquímico e gerando o curto circuito da ATP-sintase (Figura 13-7). Dessa forma, a oxidação pode prosseguir sem a fosforilação.

A RELATIVA IMPERMEABILIDADE DA MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA EXIGE TRANSPORTADORES DE TROCA

Os **sistemas de difusão por troca** envolvendo proteínas transportadoras que suplantam a membrana estão presentes na membrana para a troca de ânions por íons OH^- e de cátions por íons H^+. Tais sistemas são necessários para a captação e depuração dos metabólitos ionizados, enquanto preservam os equilíbrios elétrico e osmótico. A membrana mitocondrial interna é totalmente permeável a pequenas moléculas não carregadas, como o oxigênio, a água, o CO_2, o NH_3 e os ácidos monocarboxílicos, como os ácidos 3-hidroxibutírico, acetoacético e acético. Os ácidos graxos de cadeia longa são transportados para dentro das mitocôndrias

por meio do sistema carnitina (Figura 22-1); também existe um carreador especial para o piruvato, envolvendo um simporte que utiliza o gradiente de H^+ de fora para dentro da mitocôndria (Figura 13-10). No entanto, os ânions dicarboxilato e tricarboxilato e os aminoácidos exigem transportador ou sistemas carreadores específicos para facilitar suas passagens através da membrana. Os ácidos monocarboxílicos penetram mais facilmente em sua forma não dissociada, mais lipossolúvel.

O transporte de ânions di- e tricarboxílicos está intimamente ligado àquele do fosfato inorgânico, o qual penetra prontamente como o íon $H_2PO_4^-$ em troca do OH^-. A captação total de malato pelo transportador de dicarboxilato requer o fosfato inorgânico para a troca na direção oposta. A captação total de citrato, isocitrato ou *cis*-aconitato pelo transportador de tricarboxilato requer malato em troca. O transporte de α-cetoglutarato também exige uma troca por malato. O transportador de adenina nucleotídeo permite a troca de ATP e ADP, mas não de AMP. Ele é primordial para permitir que o ATP saia das mitocôndrias para os sítios de utilização extramitocondrial e para possibilitar o retorno do ADP para a produção de ATP dentro da mitocôndria (**Figura 13-11**). Como, nessa translocação, quatro cargas negativas são removidas da matriz para três captadas, o gradiente eletroquímico através da membrana (a força motora de prótons) favorece a exportação de ATP. O Na^+ pode ser trocado pelo H^+ dirigido pelo gradiente de prótons. Acredita-se que a captação ativa de Ca^{2+} pelas mitocôndrias ocorre com uma transferência de carga global de 1 (uniporte de Ca^+), possivelmente por meio de antiporte Ca^{2+}/H^+. A liberação de cálcio a partir das mitocôndrias é facilitada pela troca por Na^+.

Os ionóforos permitem que os cátions específicos penetrem nas membranas

Os **ionóforos** são moléculas lipofílicas que formam um complexo com cátions específicos e facilitam seu transporte pelas membranas biológicas, como, por exemplo, a **vancomicina** (K^+). Os desacopladores clássicos como o dinitrofenol são, na realidade, ionóforos de prótons.

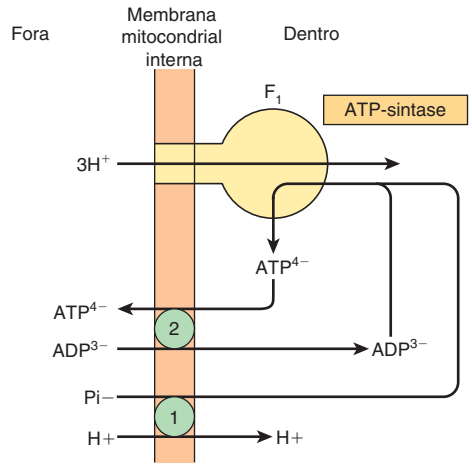


FIGURA 13-11 Combinação do transportador de fosfato (1) com o transportador de adenina nucleotídeo (2) na síntese de ATP. O simporte H^+/P_i mostrado equivale ao antiporte P_i/OH^- mostrado na Figura 13-10.

Uma transidrogenase translocadora de próton é uma fonte de NADPH intramitocondrial

A **transidrogenase ligada à energia**, proteína da membrana mitocondrial interna, acopla a passagem de prótons a favor do gradiente eletroquímico de fora para dentro da mitocôndria, com a transferência de H do NADH intramitocondrial para o NADPH por enzimas intramitocondriais, como a glutamato desidrogenase e hidroxilases envolvidas na síntese de esteroide.

A oxidação do NADH extramitocondrial é mediada por lançadeiras de substrato

O NADH não consegue penetrar na membrana mitocondrial, mas é produzida de forma contínua no citosol pela 3-fosfogliceraldeído-desidrogenase, uma enzima na sequência de glicólise (Figura 18-2). No entanto, sob condições aeróbias, o NADH extramitocondrial não se acumula, e, presume-se que seja oxidado pela cadeia respiratória nas mitocôndrias. A transferência de equivalentes de redução através da membrana mitocondrial requer pares de substrato ligados por desidrogenases adequadas em cada lado da membrana mitocondrial. O mecanismo de transferência usando a **lançadeira glicerolfosfato** é mostrada na **Figura 13-12**. Como a enzima mitocondrial está ligada à cadeia respiratória por meio de uma flavoproteína em vez de NAD, apenas 1,5 mol, e não 2,5 mol, de ATP é formado por átomo de oxigênio consumido. Embora esse transportador esteja presente em alguns tecidos (p. ex., cérebro, músculo branco), em outros (p. ex., músculo cardíaco) ele se mostra deficiente. Portanto, acredita-se que o sistema **lançadeira de malato** (**Figura 13-13**) apresenta utilidade mais universal. A complexidade deste sistema se deve à impermeabilidade da membrana mitocondrial ao oxalacetato, o qual deve reagir com o glutamato para formar aspartato e α-cetoglutarato por transaminação antes do transporte através da membrana mitocondrial e da reconstituição à oxalacetato no citosol.

O transporte de íon nas mitocôndrias é limitado pela energia

As mitocôndrias mantêm ou acumulam cátions como K^+, Na^+, Ca^{2+} e Mg^{2+}, e P_i. Supõe-se que uma bomba de prótons primária direciona a troca de cátion.

A lançadeira de creatina fosfato facilita o transporte do fosfato de alta energia a partir das mitocôndrias

Esta lançadeira (**Figura 13-14**) aumenta as funções da **creatina fosfato** como um tampão de energia ao agir como um sistema dinâmico para a transferência de fosfato de alta energia das mitocôndrias nos tecidos ativos, como o coração e o músculo esquelético. Uma isoenzima da **creatina-quinase** (CK_m) é encontrada no

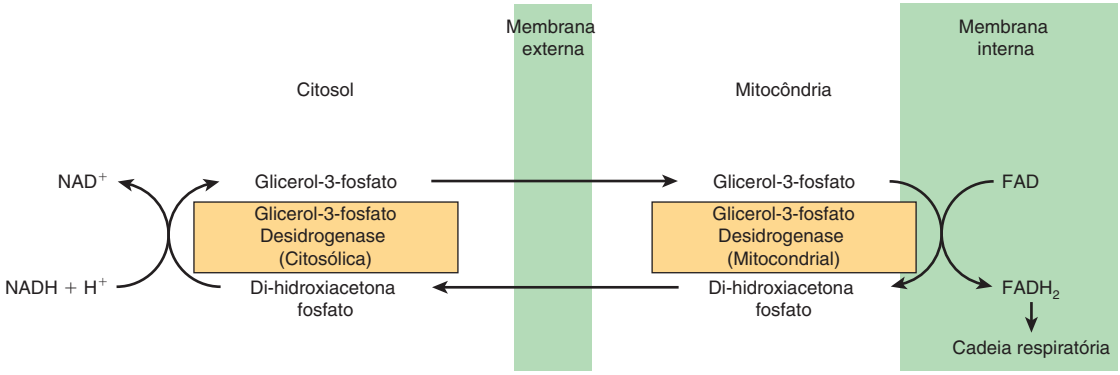


FIGURA 13-12 Lançadeira de glicerofosfato para transferência de equivalentes de redução a partir do citosol para dentro da mitocôndria.

espaço intermembrana mitocondrial, catalisando a transferência do fosfato de alta energia para a creatina a partir do ATP oriundo do transportador de adenina nucleotídeo. Por sua vez, a creatina fosfato é transportada para dentro do citosol através de poros proteicos na membrana mitocondrial externa, tornando-se disponível para a produção do ATP extramitocondrial.

ASPECTOS CLÍNICOS

A condição conhecida como **miopatia mitocondrial infantil fatal e disfunção renal** envolve a diminuição grave ou ausência da maioria das oxidorredutases da cadeia respiratória. O **MELAS** (encefalopatia mitocondrial, acidose lática e acidente vascular cerebral) é uma condição herdada devido à deficiência de NADH-Q oxidorredutase (Complexo I) ou de citocromo-oxidase (Complexo IV). Ela é causada por uma mutação no DNA mitocondrial e pode estar envolvida na **doença de Alzheimer** e no **diabetes melito**. Inúmeros medicamentos e venenos agem por meio da inibição da fosforilação oxidativa.

RESUMO

- Quase toda energia liberada a partir da oxidação de carboidratos, lipídeos e proteínas é disponibilizada nas mitocôndrias como equivalentes de redução (–H ou e^-). Estes são concentrados na cadeia respiratória, onde são transmitidos por meio de um gradiente redox de transportadores até suas reações finais com o oxigênio para formar água.
- Os transportadores redox são agrupados em quatro complexos da cadeia respiratória na membrana mitocondrial interna. Três dos quatro complexos são capazes de usar a energia liberada no gradiente redox para bombear os prótons para fora da membrana, criando um potencial eletroquímico entre a matriz e o espaço intermembranas.
- A ATP-sintase atravessa a membrana e atua como um motor rotatório que emprega a energia potencial do gradiente de prótons ou a força motora de prótons para sintetizar o ATP a partir do ADP e P_i. Dessa maneira, a oxidação está firmemente atrelada à fosforilação para satisfazer às necessidades de energia da célula.

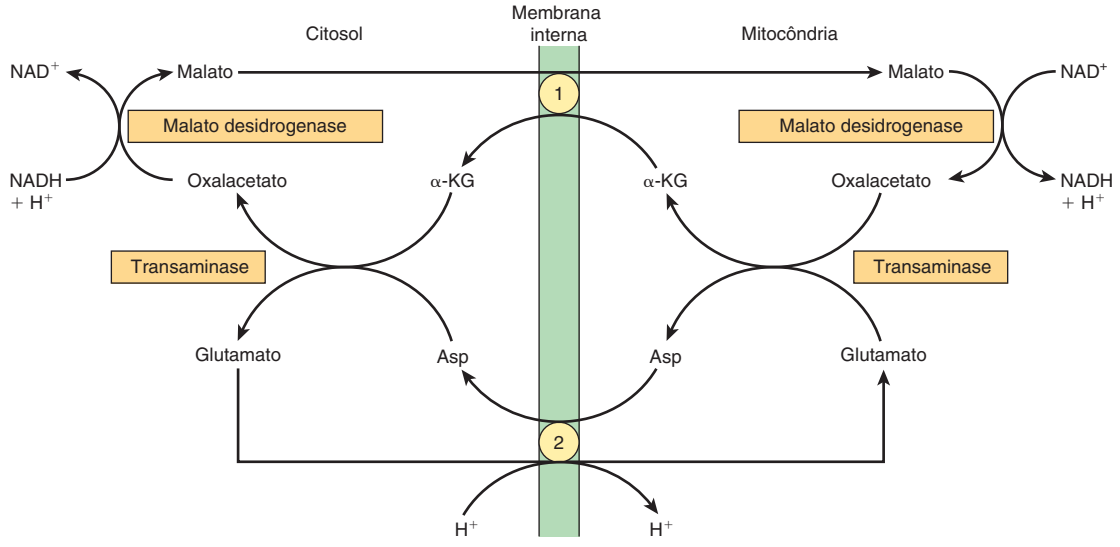


FIGURA 13-13 Lançadeira de malato para transferência de equivalentes de redução do citosol para dentro da mitocôndria. O (1) transportador de α-cetoglutarato e (2) o transportador de glutamato/aspartato (observe o simporte de próton com glutamato).

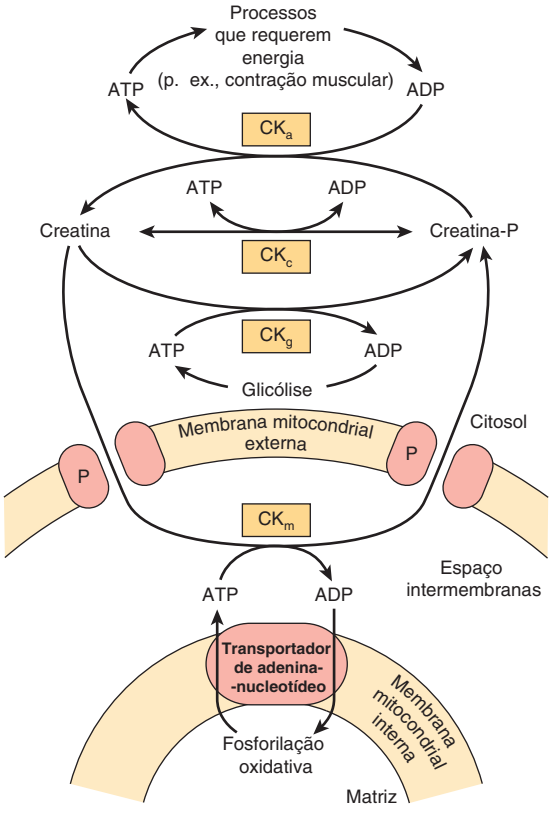


FIGURA 13-14 A lançadeira de creatina fosfato dos músculos cardíaco e esquelético. A lançadeira permite o rápido transporte do fosfato de alta energia da matriz mitocondrial para dentro do citosol. (CK_a, creatina-quinase relacionada com os grandes requisitos de ATP, p. ex., contração muscular; CK_c, creatina-quinase para manter o equilíbrio entre a creatina e a creatina-fosfato e ATP/ADP; CK_g, creatina-quinase que acopla a glicólise com a síntese de creatina-fosfato; CK_m, creatina-quinase mitocondrial que medeia a produção de creatina-fosfato a partir do ATP formado na fosforilação oxidativa; P, proteína do poro na membrana mitocondrial externa.)

- Como a membrana mitocondrial interna é impermeável aos prótons e a outros íons, os transportadores de troca especiais atravessam a membrana para permitir que íons como OH^-, ATP^{4-}, ADP^{3-} e metabólitos atravessem sem descarregar o gradiente eletroquímico através da membrana.
- Muitos venenos bem conhecidos, como o cianeto, paralisam a respiração por meio da inibição da cadeia respiratória.

REFERÊNCIAS

Hinkle PC: P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. Biochem Biophys Acta 2005;1706:1.

Kocherginsky N: Acidic lipids, H(+)-ATPases, and mechanism of oxidative phosphorylation. Physico-chemical ideas 30 years aft er P. Mitchell's Nobel Prize award. Prog Biophys Mol Biol 2009;99:20.

Mitchell P: Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. Science 1979;206:1148.

Nakamoto RK, Baylis Scanlon JA, Al-Shawi MK: Th e rotary mechanism of the ATP synthase. Arch Biochem Biophys 2008;476:43.

Smeitink J, van den Heuvel L, DiMauro S: Th e genetics and pathology of oxidative phosphorylation. Nat Rev Genet 2001;2:342.

Tyler DD: Th e *Mitochondrion in Health and Disease*. VCH Publishers, 1992.

Wallace DC: Mitochondrial DNA in aging and disease. Sci Am 1997;277:22.

Yoshida M, Muneyuki E, Hisabori T: ATP synthase—a marvelous rotary engine of the cell. Nat Rev Mol Cell Biol 2001;2:669.

CAPÍTULO

14

Carboidratos com Importância Fisiológica

David A. Bender, Ph.D. e
Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Explicar o significado dos termos monossacarídeo, dissacarídeo, oligossacarídeo e polissacarídeo.
- Ilustrar as diferentes maneiras pelas quais as estruturas da glicose e de outros monossacarídeos podem ser representadas e descrever os diversos tipos de isomerismo dos glicídeos e as estruturas anelares piranose e furanose.
- Descrever a formação dos glicosídeos e as estruturas de dissacarídeos e polissacarídeos importantes.
- Expor o significado do índice glicêmico de um carboidrato.
- Descrever os papéis dos carboidratos nas membranas celulares e lipoproteínas.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Os carboidratos estão amplamente distribuídos em vegetais e animais; eles possuem papéis estruturais e metabólicos importantes. Nos vegetais, a glicose é sintetizada a partir do dióxido de carbono e água por fotossíntese e é armazenada como amido ou utilizada para sintetizar a celulose das paredes celulares dos vegetais. Os animais podem sintetizar carboidratos a partir de aminoácidos, porém a maior parte deriva, por fim, dos vegetais. A **glicose** é o carboidrato mais importante; a maior parte dos carboidratos na dieta é absorvida para a corrente sanguínea à medida que a glicose é formada pela hidrólise do amido e dissacarídeos da dieta, sendo que outros glicídeos são convertidos em glicose no fígado. A glicose é o principal combustível metabólico dos mamíferos (exceto os ruminantes) e é o combustível universal do feto. Ela é a precursora para a síntese de todos os outros carboidratos no organismo, inclusive o **glicogênio** para armazenamento; **ribose** e **desoxirribose** nos ácidos nucleicos; **galactose** para a síntese de lactose no leite, nos glicolipídeos e em combinação com a proteína nas glicoproteínas e proteoglicanos. As doenças associadas ao metabolismo dos carboidratos incluem **diabetes melito**, **galactosemia**, **doenças de armazenamento de glicogênio** e **intolerância à lactose**.

OS CARBOIDRATOS SÃO DERIVADOS DE ALDEÍDO OU DE CETONA DE ALCOÓIS POLI-HIDRATADOS

Os carboidratos são classificados da seguinte maneira:

1. **Monossacarídeos** são aqueles açúcares que não podem ser hidrolisados em carboidratos mais simples. Eles podem ser classificados como **trioses**, **tetroses**, **pentoses**, **hexoses** ou **heptoses**, dependendo do número de átomos de carbono (de três a sete), e como **aldoses** ou **cetoses**, em função dos grupamentos aldeído ou cetona. Os exemplos estão listados na **Tabela 14-1**. Além dos aldeídos e cetonas, os alcoóis poli-hidratados (alcoóis de açúcar ou **polióis**), nos quais o grupamento aldeído ou cetona foi reduzido a um grupamento álcool, também ocorrem naturalmente nos alimentos. Eles são sintetizados por redução de monossacarídeos para uso na elaboração de alimentos para redução de peso e para diabéticos. Eles são mal absorvidos e possuem aproximadamente metade do poder energético dos glicídeos.
2. Os **dissacarídeos** são produtos de condensação de duas unidades monossacarídicas, por exemplo, lactose, maltose, sacarose e trealose.
3. Os **oligossacarídeos** são produtos de condensação de três a dez monossacarídeos. A maior parte não é digerida pelas enzimas humanas.

TABELA 14-1 Classificação de açúcares importantes

	Aldoses	Cetoses
Trioses ($C_3H_6O_3$)	Glicerose (gliceraldeído)	Di-hidroxiacetona
Tetroses ($C_4H_8O_4$)	Eritrose	Eritrulose
Pentoses ($C_5H_{10}O_5$)	Ribose	Ribulose
Hexoses ($C_6H_{12}O_6$)	Glicose	Frutose
Heptoses ($C_7H_{14}O_7$)	—	Sedoheptulose

4. Os **polissacarídeos** são produtos de condensação de mais de dez unidades monossacarídicas; os exemplos são os amidos e as dextrinas, os quais podem ser polímeros lineares ou ramificados. Os polissacarídeos são por vezes chamados de hexosanos ou pentosanos, dependendo da identidade dos monossacarídeos constituintes (hexoses e pentoses, respectivamente). Além dos amidos e das dextrinas, os alimentos contêm uma ampla variedade de outros polissacarídeos que são coletivamente conhecidos como polissacarídeos não amídicos; eles não são digeridos pelas enzimas humanas e formam o maior componente da fibra da dieta. Os exemplos consistem na celulose a partir das paredes celulares vegetais (um polímero da glicose) e na inulina, o carboidrato de armazenamento em alguns vegetais (um polímero da frutose).

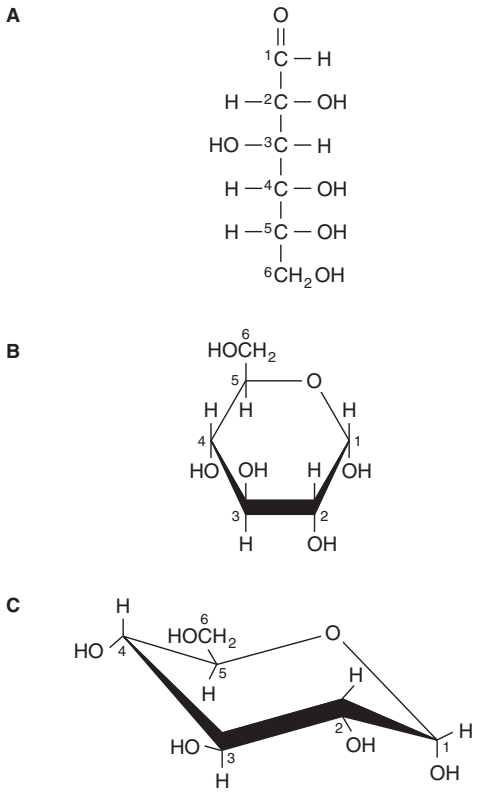


FIGURA 14-1 D-Glicose. (**A**) Forma em cadeia aberta. (**B**) α-D-glicose; projeção de Haworth. (**C**) α-D-glicose; forma de cadeira.

DO PONTO DE VISTA BIOMÉDICO, A GLICOSE É O MONOSSACARÍDEO MAIS IMPORTANTE

A estrutura da glicose pode ser representada de três maneiras

A fórmula estrutural de cadeia aberta (aldohexose; **Figura 14-1A**) pode contribuir para algumas das propriedades da glicose, porém uma estrutura cíclica (um **hemiacetal** formado pela reação entre o grupamento aldeído e um grupamento hidroxila) é favorecida do ponto de vista termodinâmico e contribui para outras propriedades. A estrutura cíclica é normalmente desenhada como é mostrado na **Figura 14-1B**, a projeção de Haworth, na qual a molécula é visualizada lateralmente e acima do plano do anel; as ligações mais próximas ao observador em negrito e espessadas, com os grupamentos hidroxila acima ou abaixo do plano do anel. O anel de seis membros contendo um átomo de oxigênio é, na realidade, em forma de cadeira (**Figura 14-1C**).

Os açúcares exibem diversas formas de isomerismo

A glicose, com quatro átomos de carbono assimétrico, pode formar 16 isômeros. Os tipos mais importantes de isomerismo encontrados com a glicose são os seguintes:

1. **Isomerismo D e L:** a designação de um isômero glicídico como a forma D ou de sua imagem espelhada como a forma L é determinada por sua relação espacial com o composto original dos carboidratos, o açúcar de três carbonos glicerose (gliceraldeído). As formas D e L desse açúcar e da glicose são mostradas na **Figura 14-2**. A orientação dos grupamentos –H e –OH ao redor do átomo de carbono adjacente ao carbono do álcool primário terminal (carbono 5 na glicose) determina se o açúcar pertence à série D ou L. Quando

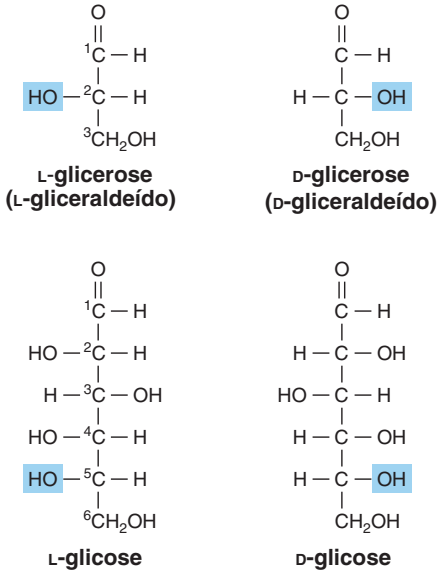


FIGURA 14-2 D- e L-isomerismo da glicerose e glicose.

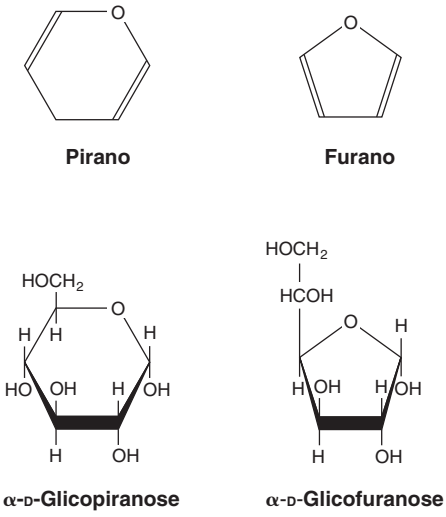


FIGURA 14-3 **Formas de piranose e furanose da glicose.**

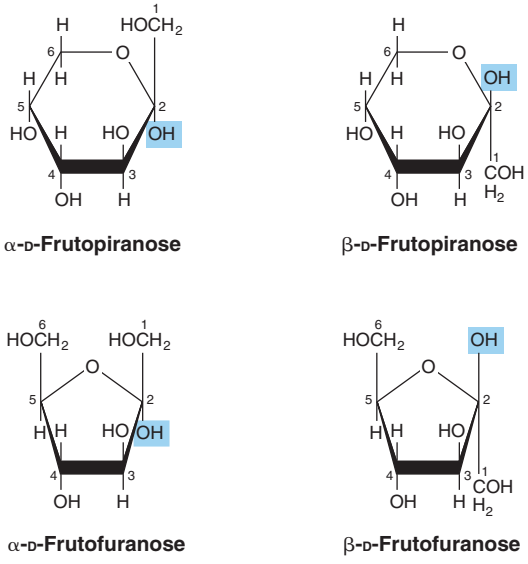


FIGURA 14-4 **Formas de piranose e furanose da frutose.**

o grupamento –OH nesse carbono está à direita (conforme notado na Figura 14-2), o glicídeo é o isômero D; quando ele está à esquerda, é o isômero L. Grande parte dos monossacarídeos de ocorrência natural são açúcares D, sendo que as enzimas responsáveis por seu metabolismo são específicas para essa configuração.

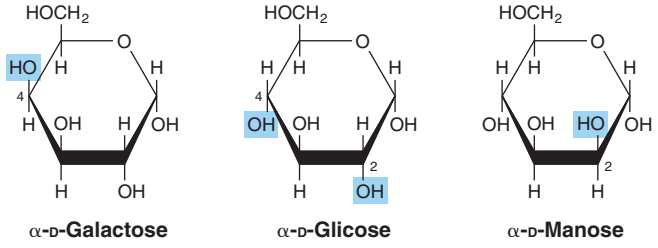


FIGURA 14-5 **Epímeros da glicose.**

A presença de átomos de carbono assimétricos também confere **atividade óptica** ao composto. Quando um feixe de luz polarizada atravessa uma solução de um **isômero óptico**, ele rota quer para a direita, dextrorrotatório (+), quer para a esquerda, levorrotatório (−). A direção da rotação da luz polarizada independe da estereoquímica do açúcar, de tal modo que ele pode ser designado D(−), D(+), L (−) ou L (+). Por exemplo, a forma de ocorrência natural da frutose é o isômero D(−). Em solução, a glicose é dextrorrotatória e as soluções de glicose são por vezes conhecidas como **dextrose**.

2. **Estruturas anelares piranose e furanose:** as estruturas anelares dos monossacarídeos são similares às estruturas anelares do pirano (um anel com seis componentes) ou do furano (um anel com cinco componentes) (**Figuras 14-3** e **14-4**). Para a glicose em solução, mais de 99% estão na forma de piranose.
3. **Anômeros alfa e beta:** a estrutura anelar de uma aldose é um hemiacetal, pois ela é formada por meio da combinação de um aldeído com um grupamento álcool. De modo similar, a estrutura anelar de uma cetose é um hemicetal. A glicose cristalina é uma α-D-glicopiranose. A estrutura cíclica é retida em solução, porém o isomerismo ocorre em torno da posição 1, a carbonila ou **átomo de carbono anomérico**, para gerar uma mistura de α-glicopiranose (38%) e β-glicopiranose (62%). Menos de 0,3% é representado por anômeros α e β da glicofuranose.
4. **Epímeros:** os isômeros que diferem em consequência de variações na configuração do –OH e do –H nos átomos de carbono 2, 3 e 4 da glicose são conhecidos como epímeros. Biologicamente, os epímeros mais importantes da glicose são a manose (epimerizada no carbono 2) e galactose (epimerizada no carbono 4) (**Figura 14-5**).
5. **Isomerismo da aldose-cetose:** a frutose possui a mesma fórmula molecular que a glicose, mas difere em sua estrutura, pois há um grupamento ceto potencial na posição 2, o carbono anomérico da frutose (**Figuras 14-4** e **14-6**), enquanto, na

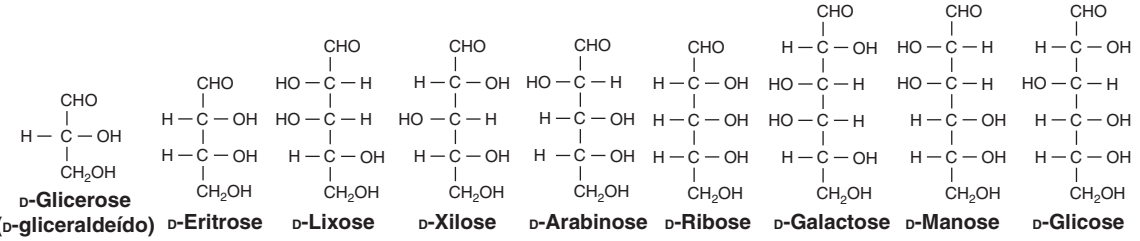


FIGURA 14-6 **Exemplos de aldoses com importância fisiológica.**

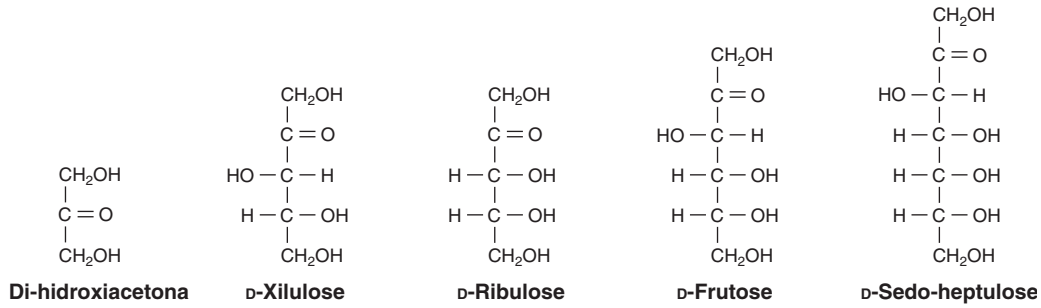


FIGURA 14-7 Exemplos de cetoses com importância fisiológica.

glicose, existe um grupamento aldeído potencial na posição 1, o carbono anomérico (**Figuras 14-2** e **14-7**).

Muitos monossacarídeos são fisiologicamente importantes

Os derivados de trioses, tetroses e pentoses e de um açúcar com sete carbonos (sedo-heptulose) são formados como intermediários metabólicos na glicólise (Capítulo 18) e na via das pentoses-fosfato (Capítulo 21). As pentoses são importantes em nucleotídeos, ácidos nucleicos e diversas coenzimas (**Tabela 14-2**). Glicose, galactose, frutose e manose são, do ponto de vista fisiológico, as hexoses mais importantes (**Tabela 14-3**). As cetoses bioquimicamente importantes são mostradas na Figura 14-6, e as aldoses na Figura 14-7.

Além disso, os derivados de ácido carboxílico da glicose são importantes, incluindo o D-glicuronato (para a formação da glicuronida e nos glicosaminoglicanos) e seus derivados metabólicos, L-iduronato (nos glicosaminoglicanos) (**Figura 14-8**) e L-gulonato (um intermediário na via do ácido urônico. Ver Figura 21-4).

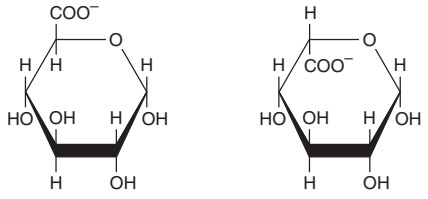


FIGURA 14-8 α-D-Glicuronato (*à esquerda*) e β-L-Iduronato (*à direita*).

TABELA 14-2 Pentoses com importância fisiológica

Açúcar	Origem	Importância bioquímica e clínica
D-Ribose	Ácidos nucleicos e intermediários metabólicos	Componente estrutural dos ácidos nucleicos e coenzimas, inclusive ATP, NAD(P) e coenzimas flavina
D-Ribulose	Intermediário metabólico	Intermediário na via das pentoses-fosfato
D-Arabinose	Gomas vegetais	Constituinte das glicoproteínas
D-Xilose	Gomas vegetais, proteoglicanos, glicosaminoglicanos	Constituinte de glicoproteínas
L-Xilulose	Intermediário metabólico	Excretado na urina na pentosúria essencial

TABELA 14-3 Hexoses com importância fisiológica

Açúcar	Origem	Importância bioquímica	Significado clínico
D-Glicose	Sucos de frutas, hidrólise do amido, açúcar da cana ou beterraba, maltose e lactose	O principal combustível metabólico para os tecidos; "açúcar do sangue"	Excretada na urina (glicosúria) no diabetes melito mal controlado em consequência da hiperglicemia
D-Frutose	Sucos de fruta, mel, hidrólise do açúcar da cana ou beterraba e inulina, isomerização enzimática dos xaropes de glicose para a fabricação de alimento	Prontamente metabolizado quer via glicose ou por via direta	A intolerância hereditária à frutose leva ao acúmulo de frutose e à hipoglicemia
D-Galactose	Hidrólise da lactose	Prontamente metabolizado à glicose; sintetizado na glândula mamária para a síntese da lactose no leite. Um constituinte de glicolipídeos e glicoproteínas	Galactosemia hereditária em consequência da falha no metabolismo da galactose leva à catarata.
D-Manose	Hidrólise de gomas mananas em vegetais	Constituinte de glicoproteínas	

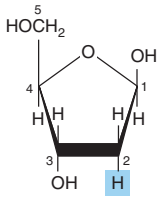


FIGURA 14-9 2-desoxi-D-ribofuranose (forma β).

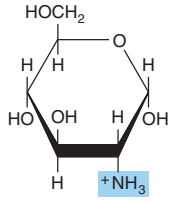


FIGURA 14-10 Glicosamina (2-amino-D-glicopiranose) (forma α). A galactosamina é a 2-amino-D-galactopiranose. Tanto a glicosamina quanto a galactosamina ocorrem como derivados *N*-acetil em carboidratos mais complexos, por exemplo, as glicoproteínas.

Os açúcares formam glicosídeos com outros compostos e entre si

Os **glicosídeos** são formados pela condensação entre o grupamento hidroxila do carbono anomérico de um monossacarídeo e um segundo composto que pode ser outro monossacarídeo ou não (no caso de uma **aglicona**). Quando o segundo grupamento é uma hidroxila, a ligação O-glicosídica é uma ligação **acetal**, porque ela resulta de uma reação entre um grupamento hemiacetal (formado a partir de um aldeído e um grupamento –OH) e outro grupamento –OH. Quando a porção hemiacetal é a glicose, o composto resultante é um **glicosídeo**; quando é a galactose, um **galactosídeo**; e assim por diante. Quando o segundo grupamento é uma amina, forma-se uma ligação *N*-glicosídica, por exemplo, entre a adenina e a ribose nos nucleotídeos como o ATP (Figura 11-4).

Os glicosídeos distribuem-se amplamente na natureza; a aglicona pode ser o metanol, o glicerol, um esterol, um fenol ou uma base, como a adenina. Os glicosídeos que são importantes na medicina devido à sua ação sobre o coração (**glicosídeos cardíacos**) contêm, sem exceção, esteroides como a aglicona. Estes incluem os derivados do digitálico e estrofanto, como a **ouabaína**, um inibidor da Na^+-K^+-ATPase das membranas celulares. Os outros glicosídeos incluem antibióticos, como a **estreptomicina**.

Os desoxiaçúcares carecem de um átomo de oxigênio

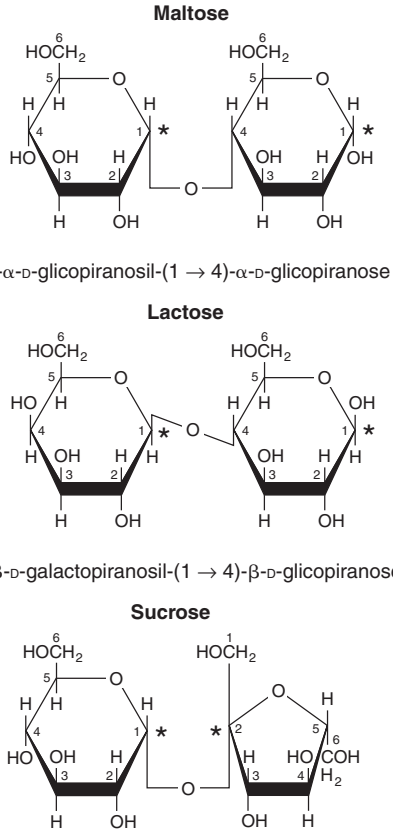
Os desoxiaçúcares são aqueles em que um grupamento hidroxila foi substituído por hidrogênio. Um exemplo é a **desoxirribose** (**Figura 14-9**) no DNA. O desoxiaçúcar L-fucose (Figura 14-13) ocorre nas glicoproteínas; a 2-desoxiglicose é utilizada experimentalmente como um inibidor do metabolismo da glicose.

Os aminoaçúcares (hexosaminas) são componentes das glicoproteínas, dos gangliosídeos e dos glicosaminoglicanos

Os aminoaçúcares incluem a D-glicosamina, um constituinte do ácido hialurônico (**Figura 14-10**), a D-galactosamina (também conhecida como condrosamina), um constituinte da condroitina, e a D-manosamina. Diversos **antibióticos** (p. ex., **eritromicina**) contêm aminoaçúcares, os quais são importantes para sua atividade metabólica.

Maltose, sacarose e lactose são dissacarídeos importantes

Os dissacarídeos são açúcares compostos por dois resíduos monossacarídicos ligados por uma ligação glicosídica (**Figura 14-11**). Os dissacarídeos fisiologicamente importantes são a maltose, a sacarose e a lactose (**Tabela 14-4**). A hidrólise da sacarose fornece uma mistura de glicose e frutose chamada de açúcar invertido, porque a frutose é fortemente levorrotatória e muda (inverte) a ação dextrorrotatória mais fraca da sacarose.



O-α-D-glicopiranosil-(1 → 4)-α-D-glicopiranose

O-β-D-galactopiranosil-(1 → 4)-β-D-glicopiranose

O-α-D-glicopiranosil-(1 → 4)-β-D-frutofuranosídeo

FIGURA 14-11 Estruturas dos dissacarídeos importantes. α e β referem-se à configuração no átomo de carbono anomérico (*). Quando o carbono anomérico do segundo resíduo toma parte na formação da ligação glicosídica, como na sacarose, o resíduo se transforma em um glicosídeo conhecido como um furanosídeo ou um piranosídeo. Como o dissacarídeo não mais possui um carbono anomérico com um grupamento aldeído ou cetona potencial livre, ele não exibe mais as propriedades de redução. A configuração do resíduo β-frutofuranose na sacarose resulta na rotação da molécula de β-frutofuranose demonstrada na Figura 14-4 em 180° e na sua inversão.

TABELA 14-4 Dissacarídeos com importância fisiológica

Açúcar	Composição	Origem	Significado clínico
Sacarose	O-α-D-glicopiranosil-(1→2)-β-D--frutofuranosídeo	Açúcar da cana e da beterraba, sorgo e algumas frutas e vegetais	A rara carência genética de sacarase leva à intolerância à sacarose – diarreia e flatulência
Lactose	O-α-D-galactopiranosil-(1→4)-β-D--glicopiranose	Leite (e muitas preparações farmacêuticas como um expansor de volume)	A falta da lactase (alactasia) leva à intolerância à lactose – diarreia e flatulência; pode ser excretado na urina durante a gestação
Maltose	O-α-D-glicopiranosil-(1→4)-α-D--glicopiranose	Hidrólise enzimática do amido (amilase); cereais em germinação e malte	
Isomaltose	O-α-D-glicopiranosil-(1→6)-α-D--glicopiranose	Hidrólise enzimática do amido (os pontos de ramificação na amilopectina)	
Lactulose	O-α-D-galactopiranosil-(1→4)-β-D--frutofuranose	Leite aquecido (pequenas quantidades), principalmente sintéticos	Não hidrolisado por enzimas intestinais, mas fermentado por bactérias intestinais; usado como um laxativo osmótico brando
Trealose	O-α-D-glicopiranosil-(1→1)-α-D--glicopiranosídeo	Leveduras e fungos; o açúcar principal da hemolinfa dos insetos	

OS POLISSACARÍDEOS TÊM FUNÇÕES DE ARMAZENAMENTO E ESTRUTURA

Os polissacarídeos incluem os seguintes carboidratos de importância fisiológica:

O **amido** é um homopolímero da glicose, formando uma cadeia α-glicosídica, chamada de **glicosano** ou **glicano**. É o mais importante carboidrato na dieta em cereais, batatas, legumes e em outros vegetais. Os dois constituintes principais são a **amilose** (13 a 20%), que apresenta uma estrutura helicoidal não ramificada, e **amilopectina** (80 a 87%), que consiste em cadeias ramificadas compostas por 24 a 30 resíduos de glicose com ligações α1→4 nas cadeias e por ligações α1→6 nos pontos de ramificação (**Figura 14-12**).

A extensão em que o amido nos alimentos é hidrolisado pela amilase é determinada por sua estrutura, pelo grau de cristalização ou hidratação (o resultado do cozimento) e se ele está incluso em paredes de células vegetais intactas (e indigeríveis). O **índice glicêmico** de um alimento amiláceo é uma medida de sua digestibilidade, com base na extensão em que ele eleva a concentração sanguínea de glicose em comparação com uma quantidade equivalente de glicose ou de um alimento de referência como o pão branco ou o arroz fervido. O índice glicêmico varia de 1 (ou 100%) para os amidos que são prontamente hidrolisados no intestino delgado até 0 para aqueles que não sofrem hidrólise.

O **glicogênio** (**Figura 14-3**) é o polissacarídeo de armazenamento em animais e, por vezes, é chamado de amido animal. É uma estrutura mais altamente ramificada que a amilopectina, com cadeias de 12 a 14 resíduos de α-D-glicopiranose (na ligação α1→ 4 glicosídica) com ramificação por meio de ligações α1→ 6 glicosídicas. Os grânulos de glicogênio no músculo (partículas β) são esféricos e contêm até 60.000 resíduos de glicose; no fígado, existem grânulos semelhantes e também rosetas de grânulos de glicogênio que parecem ser partículas β agregadas.

A **inulina** é um polissacarídeo da frutose (e, consequentemente, um frutosano) encontrado em tubérculos e raízes de dálias, alcachofras e dentes-de-leão. É prontamente solúvel em água e é utilizada para determinar a taxa de filtração glomerular, mas não é hidrolisada pelas enzimas intestinais. As **dextrinas** são interme-

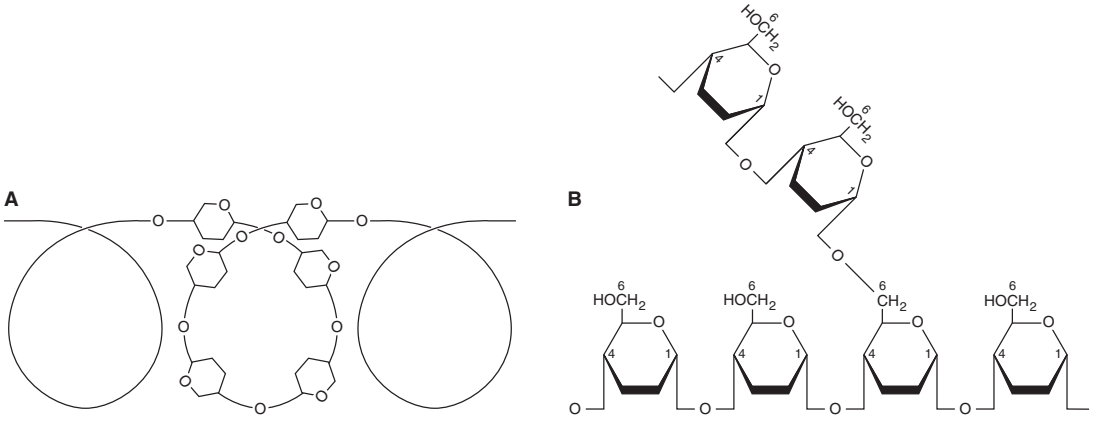


FIGURA 14-12 Estrutura do amido. (**A**) Amilose, mostrando a estrutura em mola helicoidal. (**B**) Amilopectina, mostrando o ponto de ramificação 1 → 6.

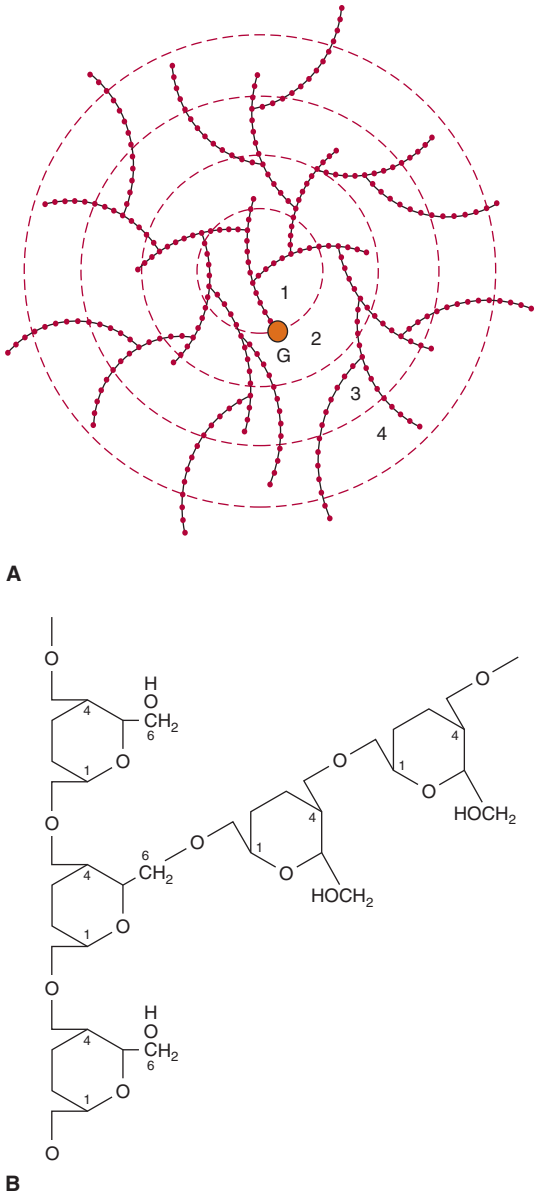


FIGURA 14-13 A molécula de glicogênio. (A) Estrutura geral. (**B**) Alargamento da estrutura no ponto de ramificação. A molécula é uma esfera de ~21 nm de diâmetro que pode ser observada em micrografias eletrônicas. Tem massa molecular de $\sim 10^7$ Da e consiste em cadeias polissacarídicas, cada qual contendo aproximadamente 13 resíduos de glicose. As cadeias são ramificadas ou não. Estão dispostas em 12 camadas concêntricas (apenas quatro são mostradas na figura). As cadeias ramificadas (cada qual com dois ramos) são encontradas nas camadas internas e as cadeias não ramificadas na camada externa. (G, glicogenina, a molécula inicial para a síntese de glicogênio.)

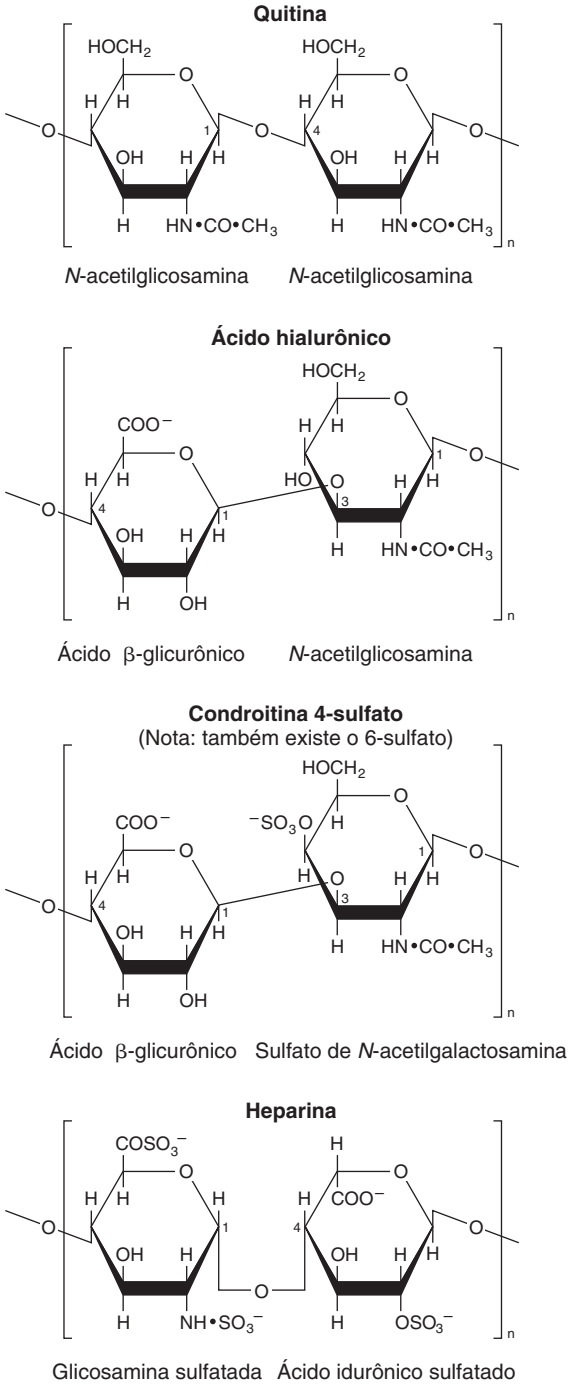


FIGURA 14-14 Estrutura de alguns polissacarídeos complexos e glicosaminoglicanos.

diários na hidrólise do amido. A **celulose** é o principal constituinte das paredes das células vegetais. É insolúvel e consiste em unidades de β-D-glicopiranose ligadas por ligações β1 → 4 para formar cadeias longas e retas fortalecidas por pontes de hidrogênio cruzadas. Os mamíferos carecem de qualquer enzima que hidrolise as ligações β1 → 4, sendo que, assim, não conseguem digerir a celulose. É uma importante fonte de "massa" na dieta e é o principal componente da fibra na dieta. Os micro-organismos no intestino dos ruminantes e de outros herbívoros podem hidrolisar a ligação e fermentar os produtos até ácidos graxos de cadeia curta como uma importante fonte de energia. Há algum metabolismo bacteriano da celulose no colo humano. A **quitina** é um polissacarídeo estrutural no exoesqueleto de crustáceos e insetos, assim como em cogumelos. Ela consiste em unidades de *N*-acetil-D-glicosamina ligadas por ligações glicosídicas β1 → 4 (**Figura 14-14**).

Os **glicosaminoglicanos** (mucopolissacarídeos) são carboidratos complexos que contêm **aminoaçúcares** e **ácidos urôni-**

TABELA 14-5 Carboidratos encontrados nas glicoproteínas

Hexoses	Manose (Man), galactose (Gal)
Acetil hexosaminas	*N*-Acetilglicosamina (GlcNAc), *N*-acetilgalactosamina (GalNAc)
Pentoses	Arabinose (Ara), Xilose (Xil)
Metil pentose	L-Fucose (Fuc, ver Figura 14-15)
Ácidos siálicos	Derivados *N*-acil do ácido neuramínico; o ácido siálico predominante é o ácido *N*-acetilneuramínico (NeuAc, ver Figura 14-16).

cos. Eles podem estar ligados a uma molécula de proteína para formar um **proteoglicano**. Os proteoglicanos propiciam a substância básica ou de sustentação do tecido conectivo. Eles detêm grandes quantidades de água e ocupam espaço, acolchoando ou lubrificando outras estruturas devido ao grande número de grupamentos –OH e das cargas negativas na molécula, que, por meio de repulsão, mantêm afastadas as cadeias de carboidratos. Os exemplos são o **ácido hialurônico**, o **condroitina sulfato** e a **heparina** (Figura 14-14).

As **glicoproteínas** (também conhecidas como mucoproteínas) são proteínas que contêm cadeias de oligossacarídeos ramificadas ou não ramificadas (**Tabela 14-5**, **Figura 14-15**); elas ocorrem nas membranas celulares (Capítulos 40 e 47) e em muitas outras situações; a albumina sérica é uma glicoproteína. Os **ácidos siálicos** são derivados *N*- ou *O*-acil do ácido neuramínico (**Figura 14-16**). O **ácido neuramínico** é um glicídeo de nove carbonos derivado da manosamina (um epímero da glicosamina) e do piruvato. Os ácidos siálicos são constituintes tanto de **glicoproteínas** quanto de **gangliosídeos**.

OS CARBOIDRATOS OCORREM NAS MEMBRANAS CELULARES E EM LIPOPROTEÍNAS

Aproximadamente 5% do peso das membranas celulares são carboidratos em glicoproteínas e em glicolipídeos. Sua presença na superfície externa da membrana plasmática (o **glicocálice**) foi demonstrada com o emprego de **lecitinas** vegetais, aglutininas proteicas que se ligam a resíduos glicosila específicos. Por exemplo, a **concanavalina A** liga-se aos resíduos α-glicosil e α-manosil. A **glicoforina** é uma glicoproteína importante integrante da membrana de eritrócitos humanos. Ela possui 130 resíduos de aminoácidos e atravessa a membrana lipídica, com regiões polipeptídicas para fora tanto da superfície externa quanto da interna (citoplasmática). As cadeias de carboidratos estão ligadas à porção aminoterminal fora da superfície externa. Os carboidratos também estão presentes na apoproteína B das lipoproteínas plasmáticas.

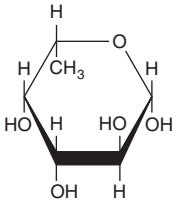


FIGURA 14-15 β-L-Fucose (6-desoxi-β-L-galactose).

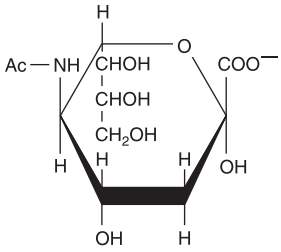


FIGURA 14-16 Estrutura do ácido *N*-acetilneuramínico, um ácido siálico (Ac = CH_3—CO—).

RESUMO

- Os carboidratos são os principais constituintes do alimento animal e dos tecidos animais. Eles caracterizam-se pelo tipo e número de resíduos monossacarídicos em suas moléculas.
- A glicose é o carboidrato mais importante na bioquímica dos mamíferos porque quase todos os carboidratos no alimento são convertidos em glicose para o metabolismo.
- Os glicídeos possuem grandes quantidades de estereoisômeros, pois eles contêm vários átomos de carbono assimétricos.
- Os monossacarídeos com importância fisiológica incluem a glicose, o "açúcar do sangue", e a ribose, importante constituinte de nucleotídeos e ácidos nucleicos.
- Os dissacarídeos importantes compreendem a maltose (glicosil glicose), um intermediário na digestão do amido; a sacarose (glicosil frutose), importante constituinte da dieta contando glicose; e a lactose (galactosil glicose), no leite.
- O amido e o glicogênio são os polímeros de armazenamento da glicose em vegetais e animais, respectivamente. O amido é a principal fonte de energia na dieta.
- Os carboidratos complexos contêm outros derivados do açúcar como os aminoaçúcares, ácidos urônicos e ácidos siálicos. Eles incluem os proteoglicanos e os glicosaminoglicanos, os quais estão associados aos elementos estruturais dos tecidos, e as glicoproteínas, que são proteínas portadoras de cadeias de oligossacarídeos; eles são encontrados em muitas situações, inclusive na membrana celular.

REFERÊNCIAS

Champ M, Langkilde A-M, Brouns F, et al: Advances in dietary fi bre characterisation. Nutrition Res Rev 2003;16:(1)71–82.

Davis BG, Fairbanks AJ: *Carbohydrate Chemistry*. Oxford University Press, 2002.

Kiessling LL, Splain RA: Chemical approaches to glycobiology. Ann Rev Biochem 2010;79:619–53.

Lindhorst TK, Th isbe K: *Essentials of Carbohydrate Chemistry* and Biochemistry, 3rd ed. Wiley-VCH, 2007.

Sinnott M: *Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*: *Structure and Mechanisms*, Royal Society of Chemistry, 2007.

CAPÍTULO 15

Lipídeos com Importância Fisiológica

Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e
Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Definir lipídeos simples e complexos e identificar as classes de lipídeos em cada grupo.
- Indicar a estrutura dos ácidos graxos saturados e insaturados, explicar como o comprimento da cadeia e o grau de insaturação influenciam seu ponto de fusão, fornecer exemplos e explicar a nomenclatura.
- Compreender a diferença entre as ligações duplas *cis* e *trans* entre átomos de carbono.
- Descrever como os eicosanoides são formados por meio da modificação da estrutura dos ácidos graxos insaturados; identificar as diversas classes dos eicosanoides e indicar suas funções.
- Delinear a estrutura geral dos triacilgliceróis e indicar suas funções.
- Esboçar a estrutura geral dos fosfolipídeos e glicoesfingolipídeos e indicar as funções das diferentes classes.
- Reconhecer a importância do colesterol como o precursor de muitos esteroides biologicamente importantes, inclusive dos hormônios esteroides, ácidos biliares e vitaminas D.
- Reconhecer o núcleo cíclico comum a todos os esteroides, explicar a diferença entre as formas de "cadeira" e "barco" dos anéis de seis carbonos e elucidar que os anéis podem ser *cis* ou *trans* em relação ao outro, possibilitando muitos estereoisômeros.
- Explicar por que os radicais livres causam danos aos tecidos e identificar os três estágios na reação em cadeia da peroxidação lipídica que os produz continuamente.
- Compreender como os antioxidantes protegem os lipídeos contra a peroxidação tanto por inibir a iniciação da cadeia quanto por romper a cadeia e fornecer exemplos fisiológicos e não fisiológicos.
- Compreender que muitas moléculas lipídicas são anfipáticas, tendo grupamentos hidrofóbicos e hidrofílicos em suas estruturas, e explicar como isso influencia seus comportamentos em um ambiente aquoso e possibilita que determinadas classes, incluindo fosfolipídeos, esfingolipídeos e colesterol, formem a estrutura básica das membranas biológicas.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Os lipídeos constituem um grupamento heterogêneo dos compostos, incluindo gorduras, óleos, esteroides, ceras e compostos afins, que são relacionados mais por suas propriedades físicas que pelas químicas. Eles têm a propriedade comum de (1) ser relativamente **insolúvel em água** e (2) ser **solúvel em solventes apolares** como o éter e o clorofórmio. Eles são importantes constituintes da dieta, não somente por seu elevado valor energético, mas também porque as **vitaminas lipossolúveis** e os **ácidos graxos essenciais** estão contidos na gordura dos alimentos naturais. A gordura é armazenada no **tecido adiposo**, onde serve como isolante térmico nos tecidos subcutâneos e ao redor de determinados órgãos. Os lipídeos apolares agem como **isolantes elétricos**, permitindo a rápida propagação das ondas de despolarização ao longo dos **nervos mielinizados**. As combina-

ções de lipídeo e proteína (lipoproteínas) servem como o meio de **transportar lipídeos** no sangue. Os lipídeos possuem papéis essenciais na nutrição e na saúde, e o conhecimento da bioquímica dos lipídeos é necessário para a compreensão de muitas patologias biomédicas importantes, incluindo **obesidade**, **diabetes melito e aterosclerose**.

OS LIPÍDEOS SÃO CLASSIFICADOS COMO SIMPLES OU COMPLEXOS

1. Lipídeos simples: ésteres de ácidos graxos com diversos alcoóis.
   a. **Gorduras:** ésteres de ácidos graxos com glicerol. Os **óleos** são gorduras em estado líquido.
   b. **Ceras:** ésteres de ácidos graxos com alcoóis monoídricos com peso molecular mais elevado.
2. L**ipídeos complexos:** ésteres de ácidos graxos contendo grupamentos além de um álcool e um ácido graxo.
   a. **Fosfolipídeos:** lipídeos que contêm, além dos ácidos graxos e um álcool, um resíduo de ácido fosfórico. Com frequência, eles têm bases nitrogenadas e outros substitutos, por exemplo, o álcool é o glicerol nos **glicerofosfolipídeos** e é a esfingosina nos **esfingofosfolipídeos**.
   b. **Glicolipídeos (glicoesfingolipídeos):** lipídeos contendo um ácido graxo, esfingosina e carboidrato.
   c. **Outros lipídeos complexos:** lipídeos como sulfolipídeos e aminolipídeos. As lipoproteínas também podem ser classificadas nesta categoria.
3. **Lipídeos precursores e derivados:** incluem ácidos graxos, glicerol, esteroides, outros alcoóis, aldeídos gordurosos, corpos cetônicos (Capítulo 22), hidrocarbonetos, vitaminas lipossolúveis e hormônios.

Como eles não possuem carga elétrica, os acilgliceróis (glicerídeos), o colesterol e os ésteres do colesterol são denominados **lipídeos neutros**.

OS ÁCIDOS GRAXOS SÃO ÁCIDOS CARBOXÍLICOS ALIFÁTICOS

Os ácidos graxos ocorrem no organismo principalmente como ésteres em óleos e gorduras naturais, mas são encontrados na forma não esterificada como **ácidos graxos livres**, uma forma de transporte no plasma. Os ácidos graxos presentes nas gorduras naturais comumente contêm um número uniforme de átomos de carbono. A cadeia pode ser **saturada** (não contendo ligações duplas) ou **insaturada** (contendo uma ou mais ligações duplas) (**Figura 15-1**).

Os ácidos graxos são nomeados de acordo com os hidrocarbonetos correspondentes

A nomenclatura sistemática mais comumente empregada nomeia o ácido graxo a partir do hidrocarboneto com o mesmo número e arranjo de átomos de carbono, sendo o **–oico** substituído pelo final **–e** (sistema de Genebra). Desta maneira, os ácidos saturados terminam em **–anoico**; por exemplo, ácido octanoico, e os ácidos insaturados com ligações duplas terminam em **–enoico**; por exemplo, ácido octadecenoico (ácido oleico).

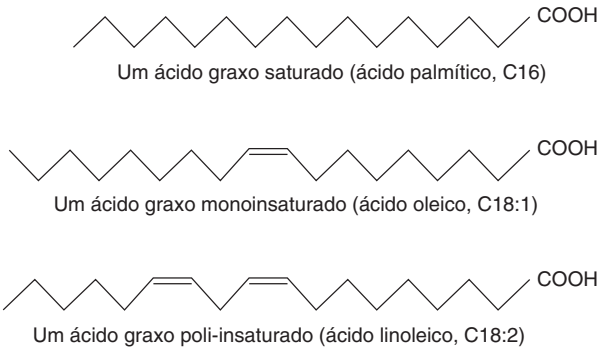


FIGURA 15-1 Ácidos graxos.

Os átomos de carbono são numerados a partir do carbono da carboxila (carbono nº 1). Os átomos de carbono adjacentes ao carbono da carboxila (nºs 2, 3 e 4) também são conhecidos como os carbonos α, β e γ, respectivamente, sendo que o carbono do metil terminal é conhecido como o carbono ω ou n.

Diversas convenções utilizam Δ para indicar o número e a posição das ligações duplas (**Figura 15-2**); por exemplo, Δ^9 indica uma ligação dupla entre os carbonos 9 e 10 do ácido graxo; ω9 indica uma ligação dupla no nono carbono a contar do carbono ω. Nos animais, ligações duplas adicionais são introduzidas apenas entre a dupla ligação já existente (p. ex., ω9, ω6 ou ω3) entre o carbono da carboxila, levando a três séries de ácidos graxos conhecidas como as famílias ω9, ω6 e ω3, respectivamente.

Os ácidos graxos saturados não contêm ligações duplas

Os ácidos graxos saturados podem ser visualizados com base no ácido acético (CH_3—COOH) como o primeiro membro da série em que o —CH_2— é progressivamente adicionado entre o CH_3— terminal e os grupamentos —COOH. Os exemplos são mostrados na **Tabela 15-1**. Sabe-se que existem outros membros maiores das séries, principalmente nas ceras. Alguns ácidos graxos de cadeia ramificada também foram isolados a partir de fontes vegetais e animais.

Os ácidos graxos insaturados contêm uma ou mais ligações duplas

Os ácidos graxos insaturados (Figura 15-1, **Tabela 15-2**) podem ser adicionalmente subdivididos da seguinte maneira:

1. **Ácidos monoinsaturados** (monoetenoide, monoenoico), contendo uma ligação dupla.

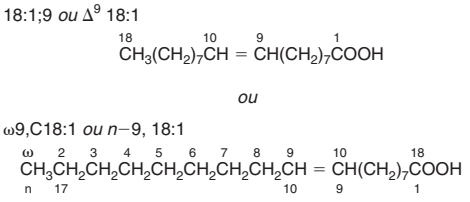


FIGURA 15-2 Ácido oleico. *n-9* equivale a ω9.

TABELA 15-1 Ácidos graxos saturados

Nome comum	Número de átomos de C	
Acético	2	Principal produto terminal da fermentação de carboidratos por organismos ruminantes
Butírico	4	Em determinados lipídeos em pequenas quantidades (principalmente a manteiga). Um produto final da fermentação de carboidratos por organismos ruminantes[1]
Valérico	5	
Caproico	6	
Láurico	12	Espermacete, canela, óleos de coco, palma, laurel, manteiga
Mirístico	14	Noz moscada, palma, óleos de coco, murta, manteiga
Palmítico	16	Comum em todas as gorduras animais e vegetais
Esteárico	18	

[1]Também formado no ceco de herbívoros e, em menor extensão, no colo de seres humanos.

2. **Ácidos poli-insaturados** (polietenoides, polienoicos), contendo duas ou mais ligações duplas.

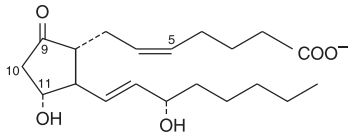


FIGURA 15-3 Prostaglandina E_2 (PGE_2).

3. **Eicosanoides:** estes compostos, derivados de ácidos graxos eicosa polienoicos (20 carbonos), compreendem os **prostanoides, leucotrienos** (**LTs**) e **lipoxinas** (**LXs**). Os prostanoides incluem as **prostaglandinas** (**PGs**), **prostaciclinas** (**PGIs**) e **tromboxanos** (**TXs**).

Há **prostaglandinas** em quase todos os tecidos de mamíferos, atuando como hormônios locais; elas apresentam importantes atividades fisiológicas e farmacológicas. Elas são sintetizadas *in vivo* por meio da ciclização do centro da cadeia de carbonos de ácidos graxos poli-insaturados (eicosanoicos) (p. ex., ácido araquidônico) para formar um anel de ciclopentano (**Figura 15-3**). Uma série relacionada de compostos, os **tromboxanos**, possui o anel do ciclopentano interrompido por um átomo de oxigênio (anel oxano) (**Figura 15-4**). Tres ácidos graxos eicosanoicos diferentes dão origem a três grupos de eicosanoides caracterizados pelo número de ligações duplas nas cadeias laterais; por exemplo, PG_1, PG_2 e PG_3. Os diferentes grupamentos substitutos acoplados aos anéis dão

TABELA 15-2 Ácidos graxos insaturados com significado fisiológico e nutricional

Número de átomos de C e número e posição das duplas ligações comuns	Família	Nome comum	Nome sistemático	Ocorrência
Ácidos monoenoicos (uma ligação dupla)				
16:1;9	ω7	Palmitoleico	*cis*-9-hexadecenoico	Em quase todas as gorduras.
18:1;9	ω9	Oleico	*cis*-9-octadecenoico	Possivelmente o ácido graxo mais comum nos lipídeos naturais; principalmente elevado no óleo de oliva.
18:1;9	ω9	Elaídico	*trans*-9-octadecenoico	Gorduras hidrogenadas e ruminantes.
Ácidos dienoicos (duas ligações duplas)				
18:2;9,12	ω6	Linoleico	todo-*cis*-9,12-octadecadienoico	Milho, amendoim, semente de algodão, soja e muitos óleos vegetais.
Ácidos trienoicos (três ligações duplas)				
18:3;6,9,12	ω6	γ-linoleico	todo-*cis*-6,9,12-octadecatrienoico	Alguns vegetais, p. ex., óleo de prímula, óleo de borragem; ácido graxo secundário em animais.
18:3;9,12,15	ω3	α-linoleico	todo-*cis*-9,12,15-octadecatrienoico	Frequentemente encontrado com o ácido linoleico, mas principalmente no óleo de linhaça.
Ácidos tetraenoicos (quatro ligações duplas)				
20:4;5,8,11,14	ω6	Aracdônico	todo-*cis*-5,8,11,14-eicosatetraenoico	Encontrado em gorduras animais; importante componente dos fosfolipídeos em animais.
Ácidos pentaenoicos (cinco ligações duplas)				
20:5;5,8,11,14,17	ω3	Timnodônico	todo-*cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	Importante componente de óleos de peixe, p. ex., fígado de bacalhau, arenque, savelha, óleos de salmão.
Ácidos hexaenoicos (seis ligações duplas)				
22:6;4,7,10,13,16,19	ω3	Cervônico	todo-*cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexanoico	Óleos de peixe, fosfolipídeos no cérebro.

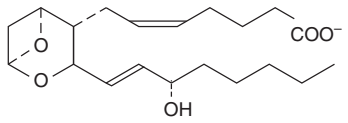


FIGURA 15-4 Tromboxano A_2 (TXA_2).

origem a séries de prostaglandinas e tromboxanos, rotuladas como A, B, etc. —, por exemplo, o tipo "E" da prostaglandina (como na PGE_2) possui um grupamento ceto na posição 9, enquanto o tipo "F" apresenta um grupamento hidroxila nessa posição. Os **leucotrienos** e as **lipoxinas** (**Figura 15-5**) constituem um terceiro grupo de derivados de eicosanoides formados pela via da lipo-oxigenase (Figura 23-11). Eles se caracterizam pela presença de três ou quatro ligações duplas conjugadas, respectivamente. Os leucotrienos provocam broncoconstrição, assim como são potentes agentes pró-inflamatórios, desempenhando uma função na **asma**.

A maioria dos ácidos graxos insaturados de ocorrência natural possui ligações duplas *cis*

As cadeias de carbono de ácidos graxos saturados formam um padrão de zigue-zague quando estendidas a baixas temperaturas (Figura 15-1). Em temperaturas mais elevadas, algumas ligações giram, provocando o encurtamento da cadeia, o que explica porque as biomembranas se tornam mais espessas com o aumento na temperatura. Um tipo de **isomerismo geométrico** ocorre em ácidos graxos insaturados, dependendo da orientação dos átomos ou dos grupamentos ao redor dos eixos das ligações duplas, o que não possibilita a rotação. Quando as cadeias de acil estão no mesmo lado da ligação, ela é *cis*-, como no ácido oleico; quando em lados opostos, ela é *trans*-, como no ácido elaídico, o isômero *trans* do ácido oleico (**Figura 15-6**). Quase todas as ligações duplas nos ácidos graxos insaturados de cadeia longa de ocorrência natural estão na configuração *cis*, e as moléculas estão "curvadas" a 120º na ligação dupla. Dessa forma, o ácido oleico apresenta um formato em L, enquanto o ácido elaídico permanece "reto". O aumento no número de ligações duplas *cis* em um ácido graxo leva a uma gama de possíveis configurações espaciais da molécula —, por exemplo, o ácido araquidônico, com suas quatro ligações duplas *cis*, está curvado em uma forma de U (**Figura 15-7**). Isso tem um significado profundo para o envoltório molecular nas membranas celulares e nas posições ocupadas por ácidos graxos em moléculas mais complexas, como os fosfolipídeos. As ligações duplas *trans* alteram essas relações espaciais. Os **ácidos graxos *trans*** estão presentes em determinados alimentos, surgindo como um subproduto da saturação dos ácidos graxos durante a hidrogenação, ou "endurecimento", de óleos naturais na fabricação da margarina. Uma pequena contribuição adicional origina-se da in-

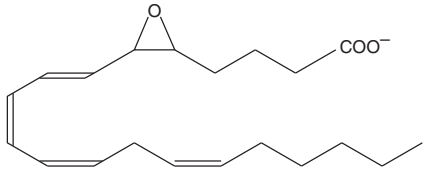


FIGURA 15-5 Leucotrieno A_4 (LTA_4).

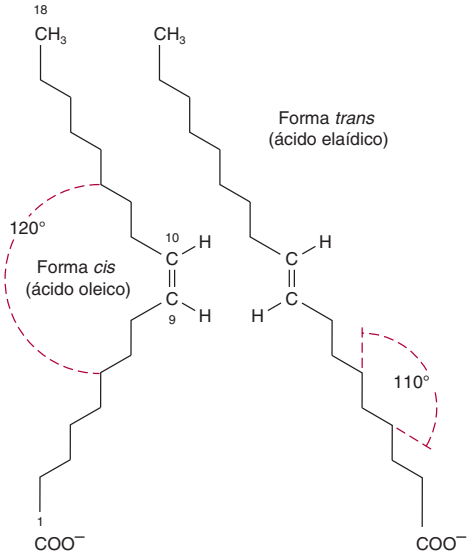


FIGURA 15-6 Isomerismo geométrico de Δ^9, ácidos graxos 18:1 (ácidos oleico e elaídico).

gestão da gordura ruminante que contém ácidos graxos *trans* que se originam da ação de microrganismos no rúmen. Atualmente, sabe-se que o consumo dos ácidos graxos *trans* é deletério para a saúde e está associado ao risco aumentado de doenças, inclusive de doença cardiovascular e de diabetes melito. Isso levou à melhoria da tecnologia para produzir margarina cremosa pobre em ácidos graxos *trans* ou que não contenha nenhum ácido graxo.

As propriedades físicas e fisiológicas de ácidos graxos refletem o comprimento da cadeia e o grau de insaturação

Os pontos de fusão de ácidos graxos com quantidades uniformes de carbono aumentam com o comprimento da cadeia e diminuem de acordo com a insaturação. Um triacilglicerol contendo três ácidos graxos saturados de 12 carbonos ou mais é sólido na temperatura corporal, enquanto se os resíduos de ácido graxo forem 18:2, ele será líquido abaixo de 0°C. Na prática, os acilglicerói naturais contêm uma mistura de ácidos graxos modelados para se adequar aos seus papéis funcionais. Os lipídeos da membrana, que devem estar líquidos em todas as temperaturas ambientes, são mais insaturados que os lipídeos de armazenamento. Os lipídeos nos tecidos que estão sujeitos ao resfriamento, como, por exemplo, nos hibernadores ou nos membros de animais, são mais insaturados.

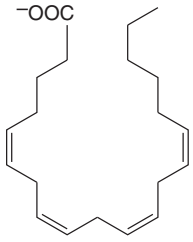


FIGURA 15-7 Ácido aracdônico.

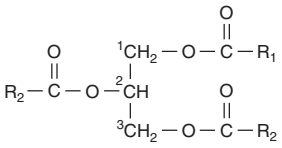


FIGURA 15-8 Triacilglicerol.

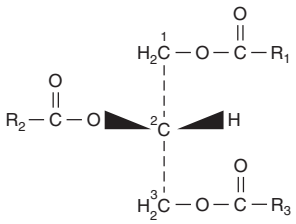


FIGURA 15-9 Triacil-*sn*-glicerol.

OS TRIACILGLICERÓIS (TRIGLICERÍDEOS)* CONSTITUEM AS PRINCIPAIS FORMAS DE ARMAZENAMENTO DOS ÁCIDOS GRAXOS

Os triacilgliceróis (**Figura 15-8**) são ésteres do álcool tri-hidratado glicerol e ácidos graxos. Os mono- e diacilgliceróis, nos quais um ou dois ácidos graxos são esterificados pelo glicerol, também são encontrados nos tecidos, e possuem particular importância na síntese e hidrólise dos triacilgliceróis.

Os carbonos 1 e 3 do glicerol não são idênticos

Para numerar os átomos de carbono do glicerol de forma inequívoca, utiliza-se o sistema –*sn* (numeração estereoquímica). É importante reconhecer que os carbonos 1 e 3 do glicerol não são idênticos quando visualizados nas três dimensões (demonstrado como uma fórmula de projeção na **Figura 15-9**). As enzimas fazem a distinção prontamente entre eles e quase sempre são específicas para um ou outro carbono; por exemplo, o glicerol sempre é fosforilado no *sn*-3 pela glicerol quinase para originar o glicerol-3-fosfato e não o glicerol-1-fosfato.

OS FOSFOLIPÍDEOS SÃO OS PRINCIPAIS CONSTITUINTES LIPÍDICOS DAS MEMBRANAS

Os fosfolipídeos podem ser considerados derivados do **ácido fosfatídico** (**Figura 15-10**), no qual o fosfato é esterificado com o —OH de um álcool adequado. O ácido fosfatídico é importante como intermediário na síntese dos triacilgliceróis, bem como dos fosfogliceróis, mas não é encontrado em grande quantidade nos tecidos.

As fosfatidilcolinas (lecitinas) ocorrem nas membranas celulares

Os fosfoacilgliceróis portadores de colina (Figura 15-10) são os fosfolipídeos mais abundantes da membrana celular e representam uma grande parcela da reserva corporal de colina. A colina

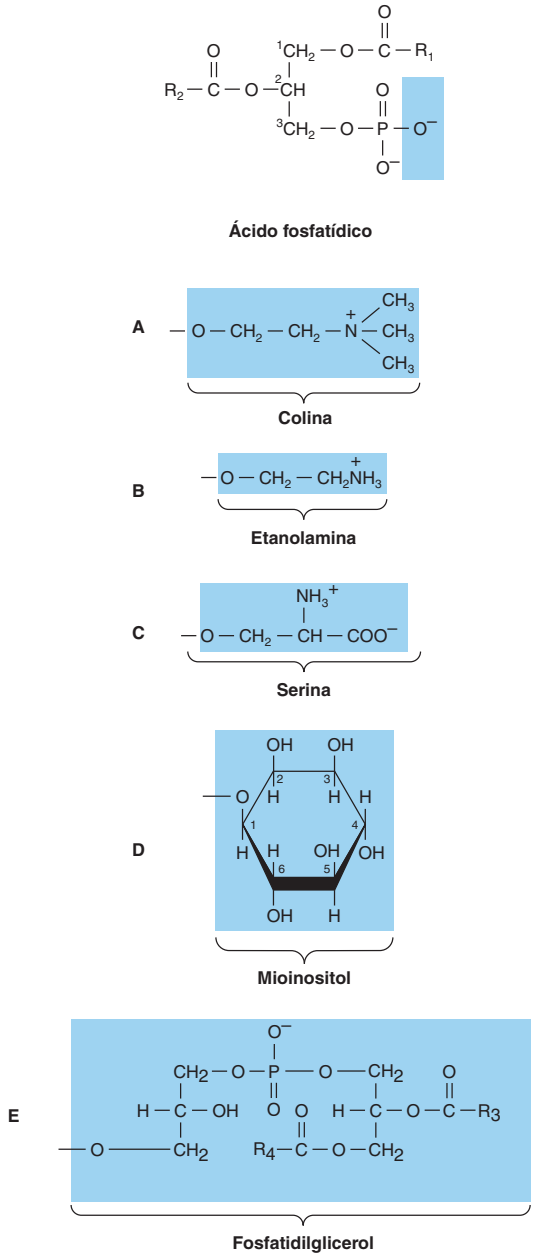


FIGURA 15-10 Ácido fosfatídico e seus derivados. O O— mostrado sombreado no ácido fosfatídico é trocado pelos substitutos mostrados para formar (**A**) 3-fosfatidilcolina, (**B**) 3-fosfatidiletanolamina, (**C**) 3-fosfatidilserina, (**D**) 3-fosfatidilinositol e (**E**) cardiolipina (difosfatidilglicerol).

* De acordo com a terminologia padronizada da International Union of Pure and Applied Chemistry e da International Union of Biochemistry, os monoglicerídeos, diglicerídeos e triglicerídeos devem ser designados monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis, respectivamente. No entanto, a antiga terminologia ainda é amplamente utilizada, em particular na medicina clínica.

é importante na transmissão nervosa, assim como a acetilcolina, e também como a reserva de grupamentos metil lábeis. O **dipalmitoil lecitina** é um agente de superfície ativo muito efetivo e um importante constituinte do **surfactante** que impede a aderência, devido à tensão de superfície, das superfícies internas dos pulmões. Sua ausência nos pulmões de lactentes prematuros provoca a **síndrome da angústia respiratória**. A maior parte dos fosfolipídeos possui um radical acil saturado na posição *sn*-1, com um radical insaturado na posição *sn*-2 do glicerol.

A **fosfatidiletanolamina** (**cefalina**) e a **fosfatidilserina** (encontrada na maioria dos tecidos) também são encontradas nas membranas celulares e diferem da fosfatidilcolina apenas pelo fato de que, nesta, a etanolamina ou a serina, respectivamente, substituem a colina (Figura 15-10). A fosfatidilserina também papel é importante na **apoptose** (morte celular programada).

O fosfatidilinositol é um precursor de mensageiros secundários

O inositol está presente no **fosfatidilinositol**, assim como no estereoisômero, mioinositol (Figura 15-10). O **fosfatidilinositol 4,5-bifosfato** é um constituinte essencial dos fosfolipídeos da membrana celular; perante a estimulação por meio de um hormônio agonista adequado, ele é clivado em **diacilglicerol** e **inositol trifosfato**, os quais atuam, ambos, como sinais internos ou mensageiros secundários.

A cardiolipina é um importante lipídeo das membranas mitocondriais

O ácido fosfatídico é um precursor do **fosfatidilglicerol**, o qual origina a **cardiolipina** (Figura 15-10). Esse fosfolipídeo é encontrado apenas na mitocôndria e é essencial para a função mitocondrial. Os níveis diminuídos de cardiolipina ou as alterações em sua estrutura ou metabolismo provocam a disfunção mitocondrial no envelhecimento e em condições patológicas, incluindo a insuficiência cardíaca, o hipotireoidismo e a síndrome de Barth (miopatia cardioesquelética).

Os lisofosfolipídeos são intermediários no metabolismo dos fosfogliceróis

Estes fosfoacilgliceróis contêm apenas um radical acil, por exemplo, **lisofosfatidilcolina** (**lisolecitina**) (**Figura 15-11**), importante no metabolismo e na interconversão dos fosfolipídeos. Ela também é encontrada em lipoproteínas oxidadas e foi implicada em alguns de seus efeitos na promoção da **aterosclerose**.

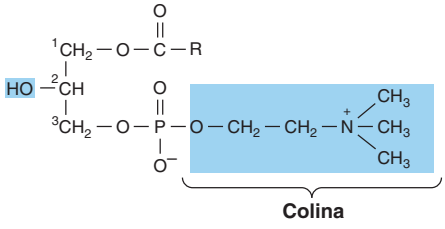


FIGURA 15-11 Lisofosfatidilcolina (lisolecitina).

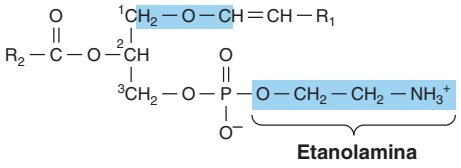


FIGURA 15-12 Plasmalogênio.

Os plasmalogênios ocorrem no cérebro e no músculo

Esses compostos constituem até 10% dos fosfolipídeos do cérebro e do músculo. Do ponto de vista estrutural, os plasmalogênios se assemelham à fosfatidiletanolamina, porém possuem uma ligação éter no carbono *sn*-1 em vez da ligação éster encontrada nos acilgliceróis. Geralmente, o radical alquil é um álcool insaturado (**Figura 15-12**). Em alguns casos, a colina, a serina ou o inositol pode substituir a etanolamina.

As esfingomielinas são encontradas no sistema nervoso

As esfingomielinas são encontradas em grandes quantidades no cérebro e tecido nervoso. Na hidrólise, as esfingomielinas fornecem um ácido graxo, ácido fosfórico, colina e um complexo amino-álcool, a **esfingosina** (**Figura 15-13**). Nenhum glicerol está presente. A combinação da esfingosina mais ácido graxo é conhecida como **ceramida**, uma estrutura também encontrada nos glicoesfingolipídeos (ver a próxima Seção).

OS GLICOLIPÍDEOS (GLICOESFINGOLIPÍDEOS) SÃO IMPORTANTES NOS TECIDOS NERVOSOS E NA MEMBRANA CELULAR

Os glicolipídeos estão amplamente distribuídos em qualquer tecido do organismo, principalmente no tecido nervoso como o cérebro. Eles ocorrem principalmente na camada externa da

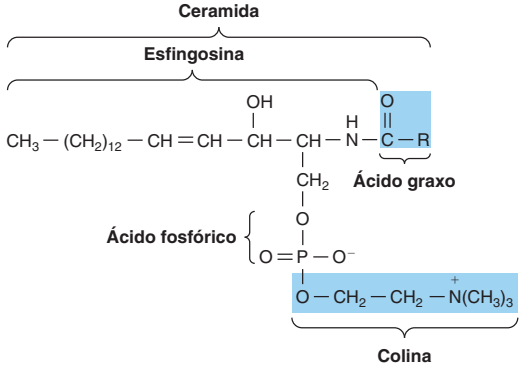


FIGURA 15-13 Uma esfingomielina.

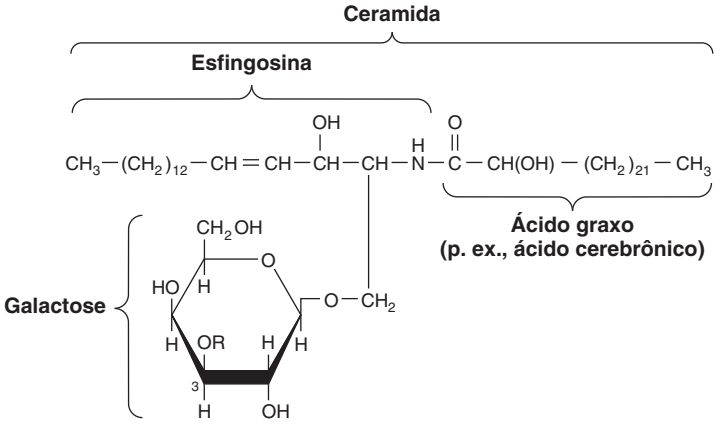


FIGURA 15-14 Estrutura da galactosilceramida (galactocerebrosídeo, R = H), e sulfogalactosilceramida (um sulfatídeo, R = SO_4^{2-}).

membrana plasmática, onde contribuem com **carboidratos da superfície celular**.

Os principais glicolipídeos encontrados nos tecidos animais são os glicoesfingolipídeos. Eles contêm ceramida e um ou mais açúcares. A **galactosilceramida** é um glicoesfingolipídeo importante do cérebro e de outros tecidos nervosos, encontrado em quantidades relativamente baixas em outros locais. Ela contém inúmeros ácidos graxos C24 característicos, como, por exemplo, o ácido cerebrônico.

A galactosilceramida (**Figura 15-14**) pode ser convertida em sulfogalactosilceramida (**sulfatídeos**), presente em grandes quantidades na **mielina**. A glicosilceramida é o glicoesfingolipídeo simples predominante nos tecidos extraneurais, também ocorrendo no cérebro em pequenas quantidades. Os **gangliosídeos** constituem glicoesfingolipídeos complexos, derivados da glicosilceramida, que contêm, além dessa, uma ou mais moléculas de um **ácido siálico**. O ácido neuramínico (NeuAc; ver Capítulo 14) é o principal ácido siálico encontrado nos tecidos humanos. Os gangliosídeos também estão presentes nos tecidos nervosos em elevadas concentrações. Eles parecem possuir a função de receptor, entre outras. O gangliosídeo mais simples encontrado nos tecidos é o GM_3, o qual contém ceramida, uma molécula de glicose, uma molécula de galactose e uma molécula de NeuAc. Na nomenclatura abreviada utilizada, G representa gangliosídeo; M é uma espécie contendo monosialo; e o subscrito 3 é um número designado com base na migração cromatográfica. O GM_1 (**Figura 15-15**), gangliosídeo mais complexo derivado do GM_3, é de considerável interesse biológico, pois se sabe que ele é o receptor no intestino humano para a toxina do cólera. Outros gangliosídeos podem conter de uma a cinco moléculas de ácido siálico, originando di-, trisialogangliosídeos, etc.

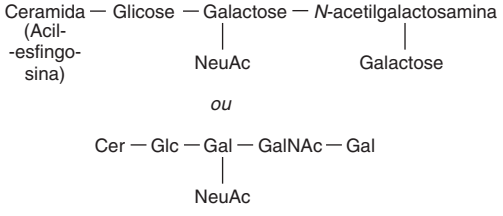


FIGURA 15-15 Gangliosídeo GM1, um monosialogangliosídeo, o receptor para a toxina do cólera no intestino humano.

OS ESTEROIDES DESEMPENHAM PAPÉIS IMPORTANTES DO PONTO DE VISTA FISIOLÓGICO

O **colesterol** é, provavelmente, o esteroide mais bem conhecido devido à sua associação com a **aterosclerose** e a doença cardíaca. Contudo, do ponto de vista bioquímico, ele também possui importância, pois é o precursor de um grande número de **esteroides** igualmente importantes, os quais incluem os ácidos biliares, os hormônios adrenocorticais, os hormônios sexuais, as vitaminas D, os glicosídeos cardíacos, os sitoesteróis do reino vegetal e alguns alcaloides.

Todos os esteroides apresentam um núcleo cíclico similar, assemelhando-se ao fenantreno (anéis A, B e C), ao qual se liga um anel de ciclopentano (D). As posições de carbono no núcleo esteroide são numeradas conforme mostrado na **Figura 15-16**. É importante imaginar que, nas fórmulas estruturais dos esteroides, um anel hexagonal simples indica um anel de seis carbonos totalmente saturado com todas as valências satisfeitas pelas pontes de hidrogênio, salvo demonstração contrária; isto é, ele não é um anel benzênico. Todas as ligações duplas são mostradas como tais. As cadeias laterais de metil são evidenciadas como ligações simples não ligadas na extremidade mais distante (metil). Geralmente, essas cadeias ocorrem nas posições 10 e 13 (constituindo os átomos de C18 e 19). Uma cadeia lateral na posição 17 é comum (como no colesterol). Quando o composto possui um ou mais grupamentos hidroxila e nenhum grupamento carbonil ou carboxil, é um **esterol**, e seu nome termina em *–ol*.

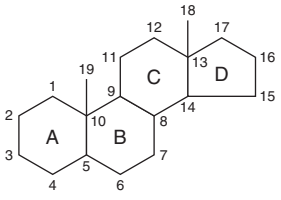


FIGURA 15-16 O núcleo do esteroide.

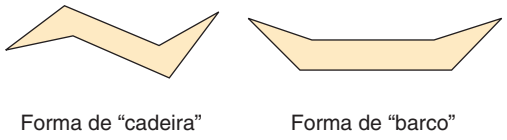


FIGURA 15-17 Conformações de estereoisômeros do núcleo esteroide.

Devido à assimetria na molécula de esteroide, muitos estereoisômeros são possíveis

Cada um dos anéis de seis carbonos do núcleo do esteroide é capaz de existir na conformação tridimensional tanto de uma “cadeira” quanto de um “barco” (**Figura 15-17**). Nos esteroides de ocorrência natural, quase todos os anéis estão na forma de “cadeira”, a qual constitui a conformação mais estável. Em relação um ao outro, os anéis podem ser *cis* ou *trans* (**Figura 15-18**). A junção entre os anéis A e B pode ser *cis* ou *trans* nos esteroides de ocorrência natural. Aquela entre B e C é *trans*, assim como frequentemente acontece na junção C/D. As ligações que fixam os grupamentos substitutos acima do plano dos anéis (ligações β) são mostradas como linhas cheias em negrito, enquanto aquelas ligações que prendem os grupamentos abaixo (ligações α) são indicadas por linhas tracejadas. O anel A de um esteroide 5α sempre é *trans* para o anel B, enquanto ela é *cis* em um esteroide 5β. Os grupamentos metil ligados a C10 e C13 estão invariavelmente na configuração β.

O colesterol é um componente significativo de muitos tecidos

O colesterol **(Figura 15-19)** está amplamente distribuído em todas as células do organismo, mas principalmente no tecido nervoso. É constituinte importante da membrana plasmática e das lipoproteínas plasmáticas. Com frequência, ele é encontrado como **éster de colesterol**, onde o grupamento hidroxila na posição 3 é esterificado por um ácido graxo de cadeia longa. Ele ocorre em animais, mas não em vegetais ou em bactérias.

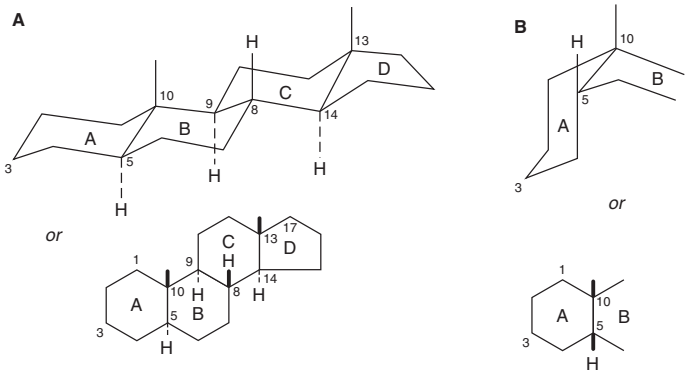


FIGURA 15-18 Núcleo esteroide generalizado, mostrando (A) uma configuração todo-*trans* entre anéis adjacentes e (B) uma configuração *cis* entre os anéis A e B.

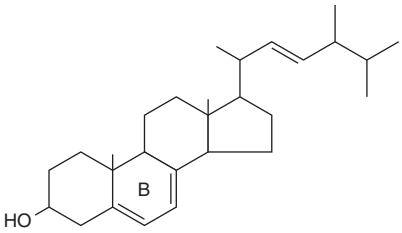


FIGURA 15-19 Colesterol, 3-hidroxi-5,6-colesteno.

O ergosterol é um precursor da vitamina D

O ergosterol ocorre em vegetais e leveduras e é importante como um precursor da vitamina D (**Figura 15-20**). Quando irradiado com luz ultravioleta, o anel B é aberto para formar a vitamina D_2 em um processo similar àquele que gera a vitamina D_3 a partir do 7-deidrocolesterol na pele (Figura 44-3).

Os poliprenoides compartilham o mesmo composto original com o colesterol

Embora não sejam esteroides, os poliprenoides estão relacionados porque são sintetizados, como o colesterol (Figura 26-2), a partir de unidades de isopreno de cinco carbonos (**Figura 15-21**). Eles compreendem a **ubiquinona** (Capítulo 13), que participa na cadeia respiratória na mitocôndria, e o álcool de cadeia longa **dolicol** (**Figura 15-22**), o qual toma parte na síntese de glicoproteína ao transferir resíduos de carboidratos para resíduos de asparagina do polipeptídeo (Capítulo 47). Os compostos isoprenoides derivados de vegetais incluem a borracha, a cânfora, as vitaminas lipossolúveis A, D, E e K, e o β-caroteno (provitamina A).

A PEROXIDAÇÃO DO LIPÍDEO É UMA FONTE DE RADICAIS LIVRES

A peroxidação (**auto-oxidação**) dos lipídeos expostos ao oxigênio é responsável não somente pela deterioração dos alimentos (**rançoso**), mas também por danos aos tecidos *in vivo*, podendo constituir uma causa de câncer, doenças inflamatórias, aterosclerose e envelhecimento. Considera-se que os efeitos deletérios são causados por **radicais livres** ($ROO^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$, $OH^{\bullet}$) produzidos durante a formação de peróxido a partir de ácidos graxos contendo ligações duplas metileno-interrompidas, isto é, aquelas encontradas em ácidos graxos poli-insaturados de ocorrência natural (**Figura 15-23**). A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia

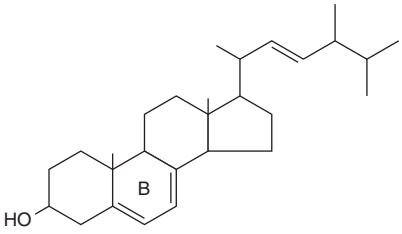


FIGURA 15-20 Ergosterol.

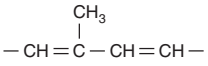


FIGURA 15-21 Unidade de isopreno.

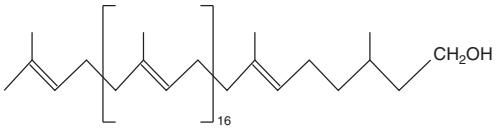


FIGURA 15-22 Dolicol —um álcool C95.

que propicia um suprimento contínuo de radicais livres, o qual inicia mais peroxidação e, assim, tem efeitos potencialmente devastadores. O processo como um todo pode ser demonstrado da seguinte maneira:

1. Início:

$$ROOH + Metal^{(n)+} \rightarrow ROO^{\bullet} + Metal^{(n-1)+} H+$$
$$X^{\bullet} + RH \rightarrow R^{\bullet} + XH$$

2. Propagação:

$$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$$
$$ROO^{\bullet} + RH \rightarrow ROOH + R^{\bullet}, \text{ etc}$$

3. Término:

$$ROO^{\bullet} + ROO^{\bullet} \rightarrow + ROOR + O_2$$
$$ROO^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow ROOR$$
$$R^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow RR$$

Para controlar e reduzir a peroxidação lipídica, tanto os seres humanos em suas atividades quanto a natureza usam **antioxidantes**. O galato de propila, o hidroxianisol butilado (BHA) e o hidroxitolueno butilado (BHT) são antioxidantes empregados como aditivos alimentares. Os antioxidantes de ocorrência natural incluem a vitamina E (tocoferol), que é lipossolúvel, bem como o urato e a vitamina C, que são hidrossolúveis. O betacaroteno é um antioxidante em PO_2 baixo. Os antioxidantes estão em duas classes: (1) antioxidantes preventivos, que reduzem a velocidade de iniciação da cadeia, e (2) antioxidantes que interrompem a cadeia, que interferem na propagação da cadeia. Os antioxidantes preventivos incluem a catalase e outras peroxidases, como a glutationa peroxidase (Figura 21-3), que reagem com o ROOH; selênio, que é um componente essencial da glutationa peroxidase e que regula a sua atividade, e os quelantes de íons metálicos como o EDTA (etilenodiaminotetraacetato) e DTPA (dietilenotriaminopentacetato). *In vivo*, os principais antioxidantes que interrompem a cadeia são a superóxido dismutase, que age na fase aquosa para dismutar os radicais superóxido livres ($O_2^{\bullet-}$) urato, e a vitamina E, que atua na fase lipídica para sequestrar os radicais $ROO^{\bullet}$ (Figura 44-6).

A peroxidação também é catalisada *in vivo* por compostos heme e por **lipo-oxigenases** encontradas em plaquetas e leucócitos. Os outros produtos de auto-oxidação ou de oxidação enzimática com significado fisiológico incluem os **oxiesteróis** (formados a partir do colesterol) e os **isoprostanos** (formados a partir da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados como o ácido araquidônico).

OS LIPÍDEOS ANFIPÁTICOS SE AUTO-ORIENTAM NAS INTERFACES ÓLEO:ÁGUA

Eles formam membranas, micelas, lipossomos e emulsões

Em geral, os lipídeos são insolúveis em água, pois contêm uma predominância de grupamentos não polares (hidrocarbonetos). No entanto, ácidos graxos, fosfolipídeos, esfingolipídeos, sais biliares e, em menor grau, o colesterol, contêm grupamentos polares. Portanto, uma parte da molécula é **hidrofóbica**, ou insolúvel em água, e uma parte é **hidrofílica**, ou solúvel em água. Essas moléculas são descritas como **anfipáticas** (**Figura 15-24**). Elas se tornam orientadas nas interfaces óleo-agua, com o grupamento polar na fase aquosa e o grupamento não polar na fase oleosa. Uma camada dupla desses lipídeos anfipáticos constitui a estrutura básica nas **membranas** biológicas (Capítulo 40). Quando uma concentração crítica desses lipídeos está presente

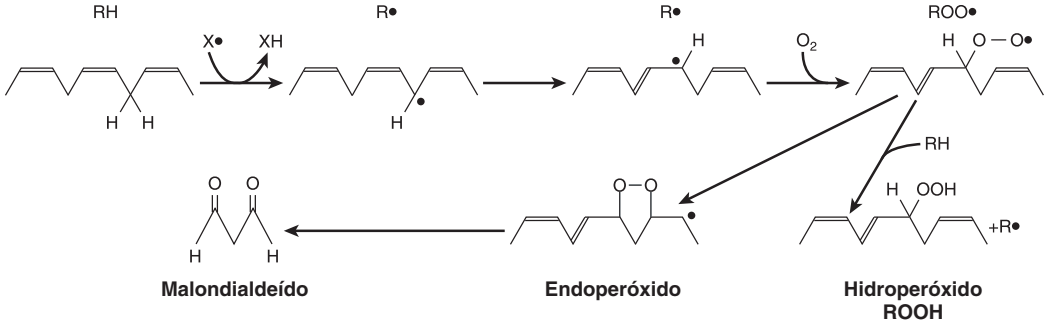


FIGURA 15-23 Peroxidação lipídica. A reação é iniciada por um radical livre existente (X•), pela luz ou por íons metálicos. O malondialdeído somente é formado por ácidos graxos com três ou mais ligações duplas e é utilizado como uma medida da peroxidação lipídica, juntamente ao etano oriundo dos dois carbonos terminais de ácidos graxos ω3 e do pentano originário dos cinco carbonos terminais de ácidos graxos ω6.

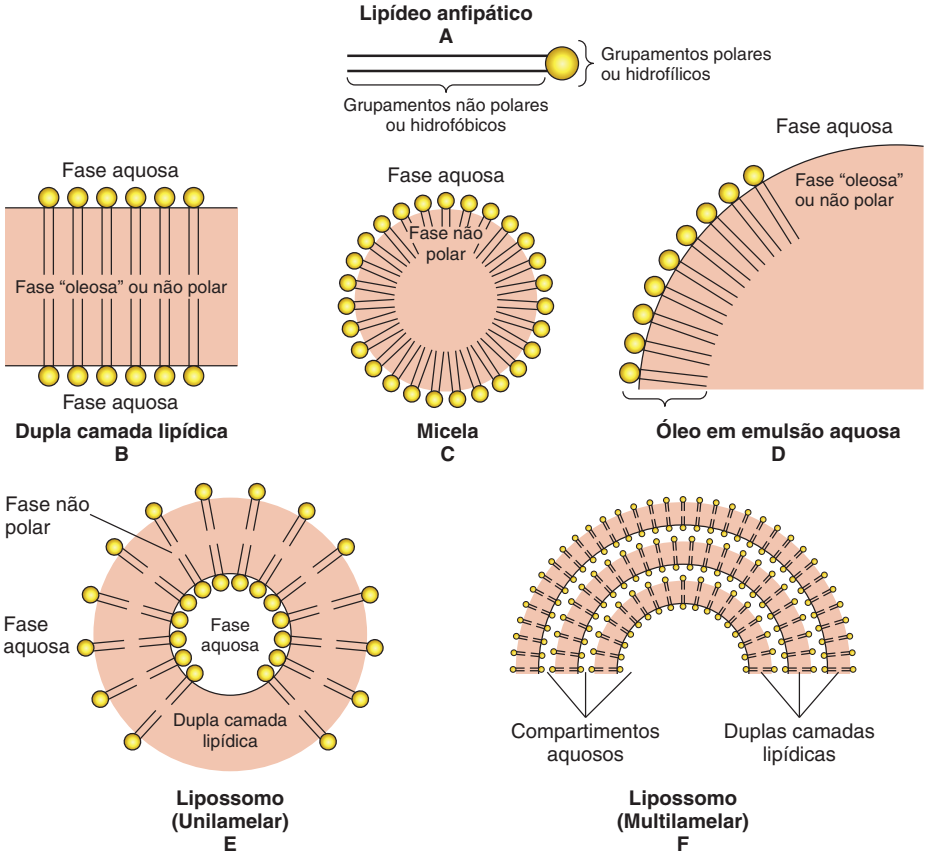


FIGURA 15-24 Formação de membranas lipídicas, micelas, emulsões e lipossomos a partir de lipídeos anfipáticos, por exemplo, os fosfolipídeos.

em um meio aquoso, eles formam **micelas**. Os **lipossomos** podem ser formados pela sonicação de um lipídeo anfipático em um meio aquoso. Eles consistem em esferas de duplas camadas lipídicas que cercam parte do meio aquoso. As agregações de sais biliares nas micelas e nos lipossomos e a formação de micelas mistas com produtos da digestão lipídica são importantes na facilitação da absorção dos lipídeos a partir dos intestinos. Os lipossomos apresentam uso clínico potencial – principalmente quando combinados a anticorpos tecido-específicos – como transportadores de medicamentos na circulação, direcionados para órgãos específicos, como, por exemplo, na terapia do câncer. Além disso, eles são utilizados para a transferência de gene para dentro das células vasculares e como transportadores para o fornecimento de medicamentos tópicos e transdérmicos e cosméticos. As **emulsões** são partículas muito maiores, comumente formadas pela emulsificação de agentes como lipídeos anfipáticos (p. ex., lecitina), os quais formam uma camada superficial que separa a massa principal do material não polar da fase aquosa (Figura 15-24).

RESUMO

- Os lipídeos possuem a propriedade comum de ser relativamente insolúveis em água (hidrofóbicos), mas solúveis em solventes não polares. Os lipídeos anfipáticos também contêm um ou mais grupamentos polares, tornando-os apropriados como constituintes de membranas nas interfaces lipídeo-água.
- Os lipídeos de maior significado fisiológico são os ácidos graxos e seus ésteres, juntamente ao colesterol e a outros esteroides.
- Os ácidos graxos de cadeia longa podem ser saturados, monoinsaturados ou poli-insaturados, de acordo com o número de ligações duplas existente. Sua fluidez diminui com o comprimento da cadeia e aumenta de acordo com o grau de insaturação.
- Os eicosanoides são formados a partir de ácidos graxos poli-insaturados com 20 átomos de carbono e constituem um grupo importante de compostos ativos do ponto de vista fisiológico e farmacológico, conhecidos como prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas.
- Os ésteres do glicerol são, do ponto de vista quantitativo, os lipídeos mais significativos, representados pelo triacilglicerol ("gordura"), importante componente de algumas classes de lipoproteína e a forma de armazenamento de lipídeos no tecido adiposo. Os fosfoacilgliceróis são lipídeos anfipáticos e possuem papéis importantes – como os principais constituintes de membranas e da camada externa de lipoproteínas, como o surfactante no pulmão, como precursores de mensageiros secundários e como constituintes do tecido nervoso.

- Os glicolipídeos também são componentes importantes do tecido nervoso, tais como o cérebro e a camada externa da membrana celular, onde eles contribuem com carboidratos na superfície celular.
- O colesterol, um lipídeo anfipático, é um importante componente de membranas. Ele é a molécula original a partir da qual são sintetizados todos os outros esteroides no organismo, incluindo hormônios importantes como os adrenocorticais e sexuais, as vitaminas D e os ácidos biliares.
- A peroxidação dos lipídeos portadores de ácidos graxos poli-insaturados leva à produção de radicais livres que causam danos tecidos e provocam doenças.

REFERÊNCIAS

Benzie IFF: Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary infl uences. Int J Food Sci Nutr 1996;47:233.

Christie WW: *Lipid Analysis*, 3rd ed. Th e Oily Press, 2003. Dowhan W, Bodanov H, Mileykovskaya E: Functional roles of lipids in membranes. In: *Biochemistry of Lipids*, *Lipoproteins and Membranes*, 5th ed. Vance DE, Vance JE (editors). Elsevier, 2008:1–37.

Gunstone FD, Harwood JL, Dijkstra AJ: *The Lipid Handbook with CD-Rom*. CRC Press, 2007.

Gurr MI, Harwood JL, Frayn K: *Lipid Biochemistry*. Blackwell Publishing, 2002.

CAPÍTULO 16

Visão Geral do Metabolismo e Suprimento de Combustíveis Metabólicos

David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Explicar os conceitos de vias anabólicas, catabólicas e metabólicas anfibólicas.
- Descrever em linhas gerais o metabolismo dos carboidratos, dos lipídeos e dos aminoácidos em nível dos tecidos e órgãos, bem como em nível subcelular, e delinear como os combustíveis metabólicos são interconversíveis.
- Caracterizar o modo pelo qual o fluxo de metabólitos por meio das vias metabólicas é regulado.
- Elucidar como uma provisão de combustíveis metabólicos é fornecida tanto no estado alimentado quanto em jejum, assim como a formação de reservas de combustíveis metabólicos no estado alimentado e a sua mobilização durante o jejum.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Metabolismo é o termo empregado para descrever a interconversão dos compostos químicos presentes no organismo, as vias percorridas pelas moléculas individualmente, suas inter-relações e os mecanismos que regulam o fluxo de metabólitos por meio dessas vias. As vias metabólicas são classificadas em três categorias. (1) As **vias anabólicas**, envolvidas na síntese de compostos maiores e mais complexos a partir de precursores menores – como, por exemplo, a síntese de proteínas a partir de aminoácidos e a síntese de reservas de triacilgliceróis e glicogênio. As vias anabólicas são endotérmicas. (2) As **vias catabólicas**, envolvidas na degradação de moléculas maiores, geralmente incluem reações oxidativas; essas vias são exotérmicas, produzindo equivalentes redutores e, principalmente pela cadeia respiratória, ATP. (3) As **vias anfibólicas**, que ocorrem nos "cruzamentos" do metabolismo, atuam como conexões entre as vias anabólicas e catabólicas, como, por exemplo, o ciclo do ácido cítrico.

O conhecimento do metabolismo normal é essencial para uma compreensão das anormalidades subjacentes à doença. O metabolismo normal inclui adaptação aos períodos de inanição, aos exercícios físicos, à gravidez e à lactação. A ocorrência de anormalidades no metabolismo pode resultar de deficiência nutricional, de deficiências enzimáticas, da secreção anormal de hormônios ou das ações de substâncias e toxinas.

Um ser humano adulto de 70 kg necessita, diariamente, de cerca de 8 a 12 MJ (1.920 a 2.900 kcal) provenientes dos combustíveis metabólicos, dependendo da atividade física. Os animais de maior porte necessitam de menos, e os animais menores de mais, por kg de peso corporal; as crianças e os animais em crescimento têm uma necessidade proporcionalmente maior para sustentar o custo energético do crescimento. No que se refere aos seres humanos, essas demandas são supridas pelos carboidratos (40 a 60%), pelos lipídeos (principalmente triacilgliceróis, 30 a 40%) e pelas proteínas (10 a 15%), bem como pelo álcool. A mistura de carboidratos, lipídeos e proteínas que estão sendo oxidados varia conforme o indivíduo se encontre no estado alimentado ou em jejum, bem como a duração e a intensidade do trabalho físico.

A necessidade de combustíveis metabólicos é relativamente constante no decorrer do dia, visto que a atividade física média aumenta a taxa metabólica em apenas cerca de 40 a 50% em relação à taxa metabólica basal ou em repouso. Entretanto, a maioria das pessoas consome o aporte diário de combustíveis metabólicos em duas ou três refeições, de modo que existe a necessidade de formar reservas de carboidratos (glicogênio no fígado e no músculo) e de lipídeos (triacilgliceróis no tecido adiposo) depois de uma refeição para uso durante o intervalo de tempo entre uma refeição e outra, quando não há ingestão de alimento.

Se o aporte de combustíveis metabólicos for consistentemente maior do que o gasto energético, o excesso é armazenado, em grande parte, na forma de triacilgliceróis no tecido adiposo, levando ao desenvolvimento de **obesidade** e seus riscos associados para a saúde. Em contrapartida, se o aporte de combustíveis metabólicos for consistentemente menor do que o gasto energético, haverá uma reserva insignificante de gordura e de carboidratos, e os aminoácidos que surgem da renovação das

proteínas serão usados no metabolismo energético, em lugar de seu uso na síntese de proteínas para reposição, levando à **emaciação**, perda muscular e, por fim, à morte (ver Capítulo 43).

No estado alimentado, após uma refeição, existe um amplo suprimento de carboidratos, e a fonte de energia metabólica para a maioria dos tecidos é a glicose. Em condições de jejum, a glicose precisa ser preservada para uso pelo sistema nervoso central (que depende, em grande parte, da glicose) e pelos eritrócitos (que dependem totalmente da glicose). Por conseguinte, os tecidos que podem utilizar fontes de energia diferentes da glicose o fazem; o músculo e o fígado oxidam ácidos graxos, e o fígado sintetiza corpos cetônicos a partir de ácidos graxos destinados à exportação para o músculo e outros tecidos. À medida que as reservas de glicogênio sofrem depleção, os aminoácidos que provêm da renovação das proteínas são utilizados para a **gliconeogênese**.

A formação e a utilização das reservas de triacilgliceróis e de glicogênio e o grau com que os tecidos captam e oxidam a glicose são, em grande parte, controlados pelos hormônios **insulina** e **glucagon**. No **diabetes melito**, há comprometimento na síntese e na secreção de insulina (diabetes melito tipo I, algumas vezes denominado diabetes de início juvenil ou diabetes insulino-dependente) ou redução da sensibilidade dos tecidos à ação da insulina (diabetes melito tipo 2, algumas vezes denominado diabetes de início no adulto ou diabetes não insulino-dependente), resultando em grave distúrbio metabólico. Em bovinos, as demandas da lactação intensa podem levar ao desenvolvimento de cetose, assim como as demandas de gestação gemelar em ovelhas.

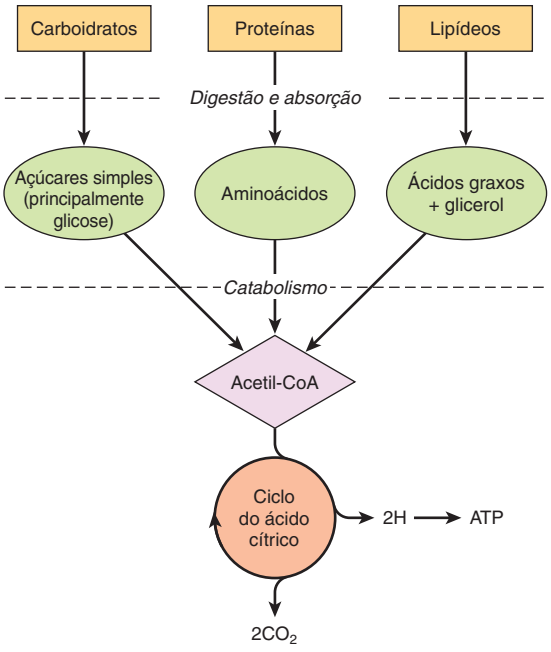


FIGURA 16-1 Resumo das vias para o catabolismo dos carboidratos, das proteínas e da gordura da alimentação. Todas as vias levam à produção de acetil-CoA, que é oxidada no ciclo do ácido cítrico, produzindo, finalmente, ATP pelo processo da fosforilação oxidativa.

VIAS QUE PROCESSAM OS PRINCIPAIS PRODUTOS DA DIGESTÃO

A natureza da alimentação estabelece o padrão básico de metabolismo. Existe uma necessidade de processar os produtos de digestão dos carboidratos, dos lipídeos e das proteínas da alimentação. Esses produtos da digestão consistem principalmente em glicose, ácidos graxos e glicerol, e aminoácidos, respectivamente. Nos ruminantes (e, em menor grau, em outros herbívoros), a celulose da alimentação é fermentada por microrganismos simbióticos em ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico, butírico), e o metabolismo nesses animais está adaptado para utilizar esses ácidos graxos como principais substratos. Todos os produtos da digestão são metabolizados a um **produto comum**, a **acetil-CoA**, que é então oxidada pelo **ciclo do ácido cítrico** (**Figura 16-1**).

O metabolismo dos carboidratos concentra-se no suprimento de glicose e seu destino

A glicose constitui a principal fonte de energia da maioria dos tecidos (**Figura 16-2**) e é metabolizada a piruvato pela via da **glicólise**. Os tecidos aeróbios metabolizam o piruvato a **acetil-CoA**, que pode entrar no ciclo do ácido cítrico para oxidação completa a CO_2 e H_2O, ligados à formação de ATP no processo de **fosforilação oxidativa** (Figura 13–2). A glicólise também pode ocorrer de modo anaeróbio (i.e., na ausência de oxigênio) quando o produto final é o lactato.

A glicose e seus metabólitos também participam de outros processos, por exemplo: (1) a síntese de **glicogênio**, o polímero de armazenamento no músculo esquelético e no fígado; (2) a **via das pentoses-fosfato**, uma alternativa para parte da via da glicólise. Trata-se de uma fonte de equivalentes redutores (NADPH) para a síntese de ácidos graxos e a fonte de **ribose** para a síntese de nucleotídeos e ácidos nucleicos; (3) as trioses-fosfato originam a fração glicerol dos triacilgliceróis. (4) o piruvato e os intermediários do ciclo do ácido cítrico fornecem os esqueletos de carbono para a síntese de **aminoácidos** não essenciais ou dispensáveis, e a acetil-CoA é o precursor dos **ácidos graxos** e do **colesterol** (e, portanto, de todos os esteroides sintetizados no organismo). A **gliconeogênese** refere-se ao processo de formação de glicose a partir de precursores não carboidratos, como, por exemplo, lactato, aminoácidos e glicerol.

O metabolismo dos lipídeos está envolvido principalmente com os ácidos graxos e o colesterol

Os ácidos graxos de cadeia longa originam-se de lipídeos da alimentação ou da síntese *de novo* a partir da acetil-CoA derivada dos carboidratos ou de aminoácidos. Os ácidos graxos podem ser oxidados a **acetil-CoA** (**β-oxidação**) ou esterificados com glicerol, formando **triacilglicerol** (gordura) como principal reserva de energia.

A acetil-CoA formada por β-oxidação pode seguir três destinos (**Figura 16-3**).

1. À semelhança da acetil-CoA que se origina da glicólise, ela é **oxidada** a $CO_2 + H_2O$ pelo ciclo do ácido cítrico.
2. É o precursor na síntese de **colesterol** e de outros **esteroides**.
3. No fígado, é usada na formação dos **corpos cetônicos** (acetoacetato e 3-hidroxibutirato), que representam importantes fontes de energia em caso de jejum prolongado e inanição.

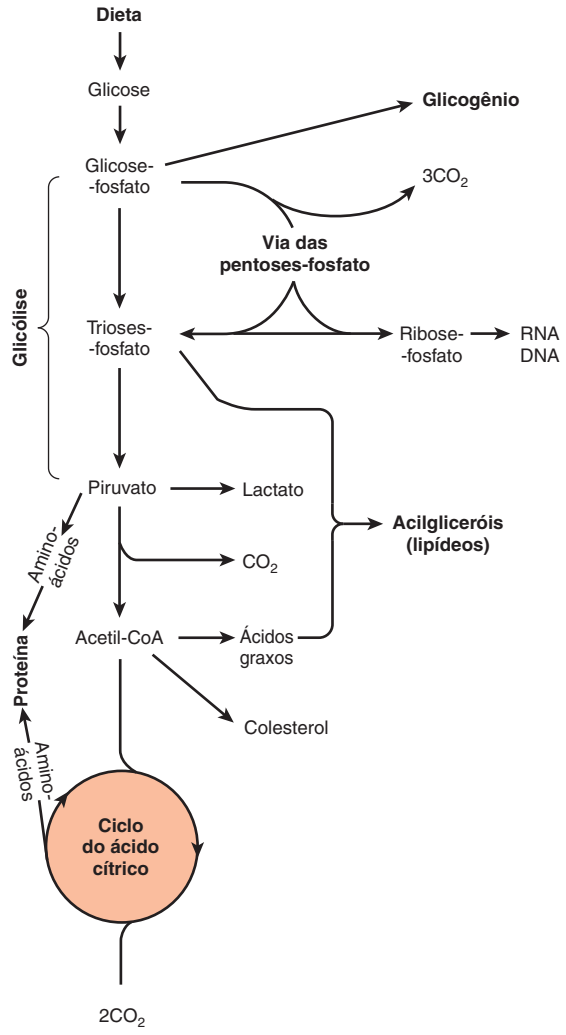


FIGURA 16-2 Visão geral do metabolismo dos carboidratos, mostrando as principais vias e produtos finais. A gliconeogênese não está incluída.

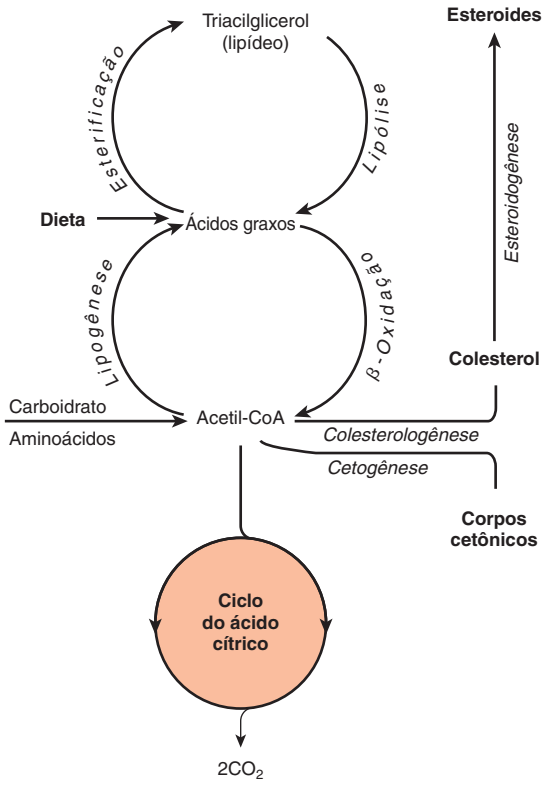


FIGURA 16-3 Visão geral do metabolismo dos ácidos graxos, mostrando as principais vias e os produtos finais. Os corpos cetônicos são o acetoacetato, o 3-hidroxibutirato e a acetona.

Grande parte do metabolismo dos aminoácidos envolve a transaminação

Os aminoácidos são necessários para a síntese de proteínas (**Figura 16-4**). Alguns precisam ser supridos na alimentação (os **aminoácidos essenciais ou indispensáveis**), já que não podem ser sintetizados no organismo. Os demais são **aminoácidos não essenciais ou dispensáveis**, que são supridos na alimentação, mas que também podem ser formados a partir de intermediários metabólicos por **transaminação,** utilizando o grupo amino de outros aminoácidos. Após **desaminação,** o nitrogênio amino é excretado na forma de **ureia**, e os esqueletos de carbono que permanecem após a transaminação podem (1) ser oxidados a CO_2 pelo ciclo do ácido cítrico, (2) ser utilizados na síntese de glicose (gliconeogênese), ou (3) formar corpos cetônicos ou acetil-CoA, que pode ser oxidada ou utilizada na síntese de ácidos graxos.

Vários aminoácidos também são precursores de outros compostos, como, por exemplo, purinas, pirimidinas, hormônios – como a epinefrina e a tiroxina – e neurotransmissores.

AS VIAS METABÓLICAS PODEM SER ESTUDADAS EM DIFERENTES NÍVEIS DE ORGANIZAÇÃO

Além dos estudos no organismo como um todo, a localização e a integração das vias metabólicas são reveladas por estudos realizados em vários níveis de organização. (1) Em **nível tecidual e orgânico**, define-se a natureza dos substratos que entram e dos metabólitos que deixam os tecidos e órgãos. (2) Em **nível subcelular**, cada organela celular (p. ex., a mitocôndria) ou compartimento (p. ex., o citosol) desempenha papéis específicos, que fazem parte de um padrão subcelular de vias metabólicas.

Em níveis tecidual e orgânico, a circulação sanguínea integra o metabolismo

Os **aminoácidos** resultantes da digestão das proteínas da dieta e a **glicose** proveniente da digestão dos carboidratos são absorvidos por meio da veia porta do fígado. O fígado desempenha a função de regular a concentração sanguínea desses metabólitos hidrossolúveis (**Figura 16-5**). No caso da glicose, isso é obtido pela captação de glicose em quantidades acima das necessidades imediatas e pelo seu uso na síntese de glicogênio (**glicogênese**, Capítulo 19) ou de ácidos graxos (**lipogênese**, Capítulo 23). Entre as refeições, o fígado atua para manter o nível de glicemia a partir da degradação do glicogênio (**glicogenólise**, Capítulo 19) e, em conjunto com o rim, converter os metabólitos não carboi-

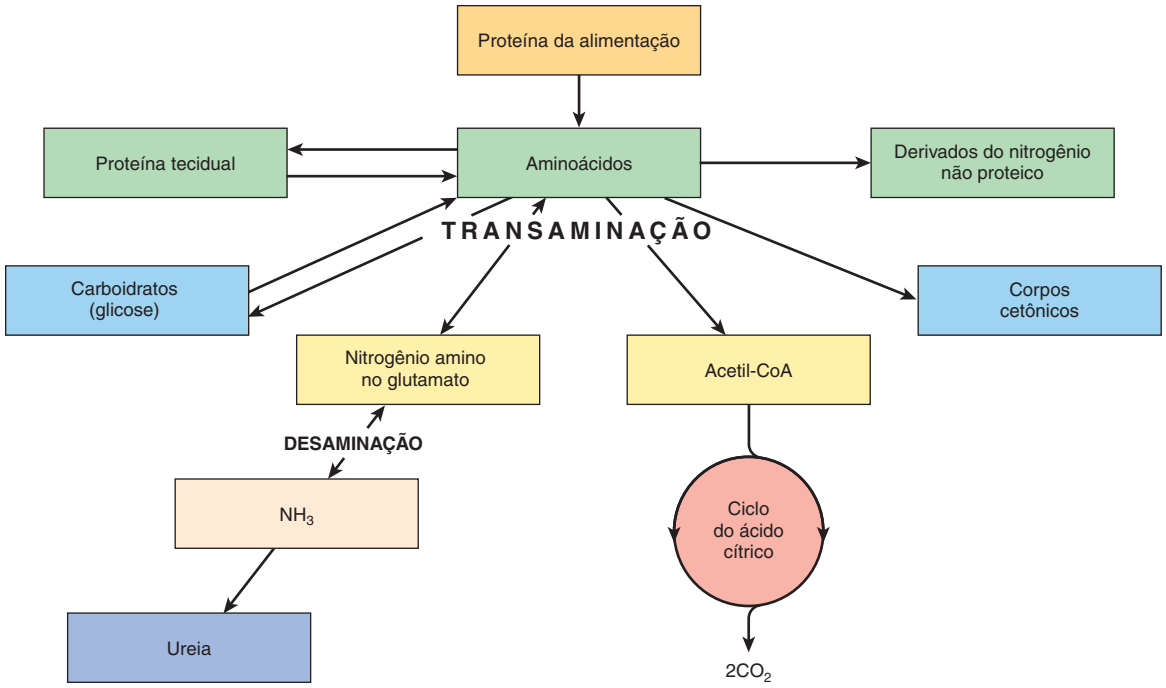


FIGURA 16-4 Visão geral do metabolismo dos aminoácidos, mostrando as principais vias e os produtos finais.

dratos, tais como lactato, glicerol e aminoácidos, em glicose (**gliconeogênese**, Capítulo 19). A manutenção de uma concentração adequada de glicose no sangue é vital para os tecidos em que ela constitui o principal substrato energético (o cérebro) ou o único substrato (eritrócitos). O fígado também **sintetiza as principais proteínas plasmáticas** (p. ex., albumina) e **desamina os aminoácidos** que estão acima das necessidades, produzindo ureia, que é transportada até o rim e excretada (Capítulo 28).

O **músculo esquelético** utiliza a glicose como fonte de energia tanto de modo aeróbio, formando CO_2, quanto anaerobia-

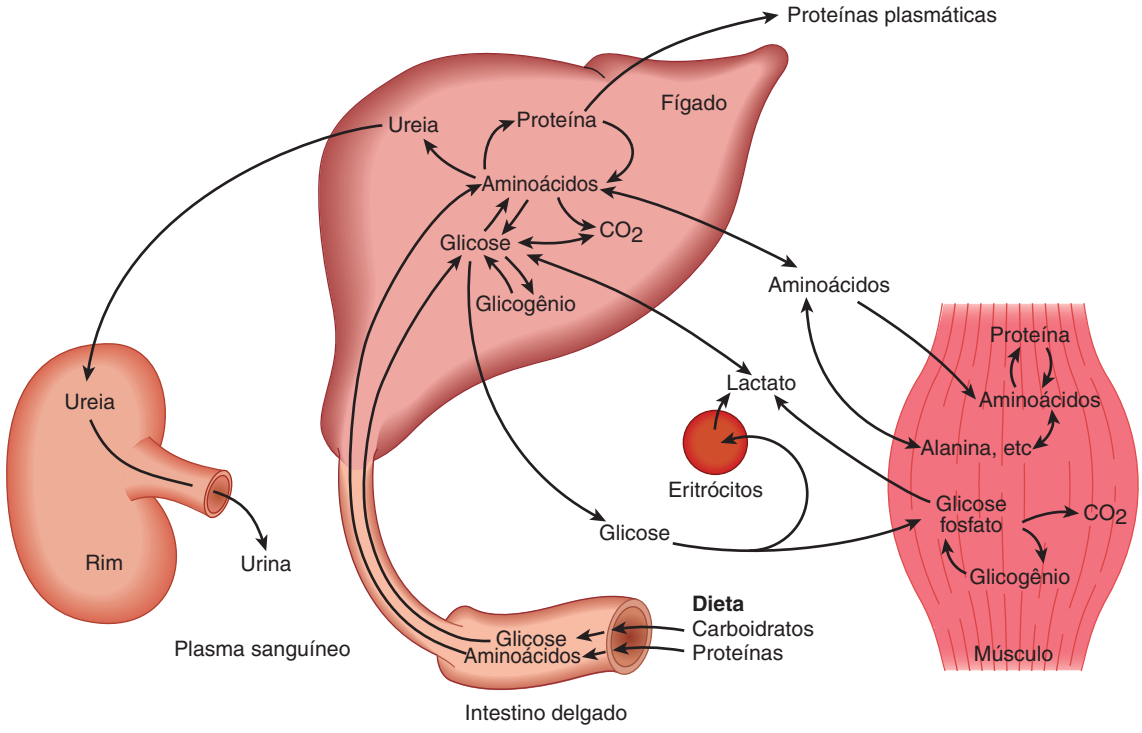


FIGURA 16-5 Transporte e destino dos principais substratos e metabólitos dos carboidratos e aminoácidos. Observe que existe pouca glicose livre no músculo, já que ela é rapidamente fosforilada no momento de sua entrada.

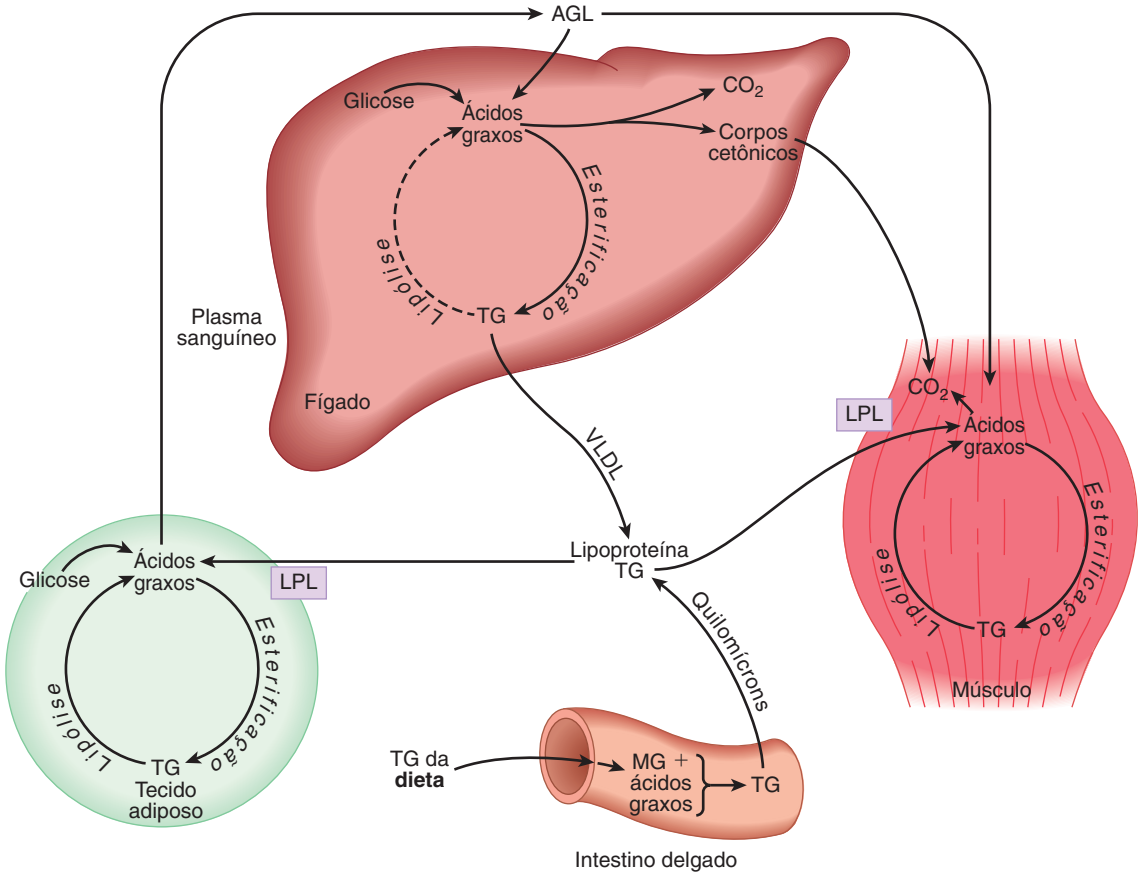


FIGURA 16-6 Transporte e destino dos principais substratos e metabólitos dos lipídeos. (AGL, ácidos graxos livres; LPL, lipase lipoproteica; MG, monoacilglicerol; TG, triacilglicerol; VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa.)

mente, formando lactato. O músculo esquelético armazena glicogênio como substrato energético para uso durante a contração muscular e sintetiza proteína muscular a partir dos aminoácidos plasmáticos. O músculo responde por cerca de 50% da massa corporal e, consequentemente, representa uma considerável reserva de proteína, que pode ser empregada para suprir aminoácidos para a gliconeogênese em caso de inanição (Capítulo 20).

Os **lipídeos** da alimentação (**Figura 16-6**) são principalmente triacilgliceróis e são hidrolisados a monoacilgliceróis e ácidos graxos no intestino, sendo então reesterificados na mucosa intestinal. Ali, são acondicionados com proteína e secretados no sistema linfático e na corrente sanguínea como **quilomícrons**, a maior das **lipoproteínas** do plasma. Os quilomícrons também contêm outros nutrientes lipossolúveis. Diferentemente da glicose e dos aminoácidos, o triacilglicerol dos quilomícrons não é captado diretamente pelo fígado. É inicialmente metabolizado por tecidos que apresentam a **lipase lipoproteica**, a enzima que hidrolisa o triacilglicerol, liberando ácidos graxos que são incorporados aos lipídeos teciduais ou oxidados como substratos energéticos. Os remanescentes de quilomícrons são depurados pelo fígado. A outra fonte importante de ácidos graxos de cadeia longa é a síntese (**lipogênese**) a partir de carboidratos no tecido adiposo e no fígado.

O triacilglicerol no tecido adiposo representa a principal reserva de substrato energético do organismo. É hidrolisado (**lipólise**), e o glicerol e ácidos graxos livres são liberados na circulação. O glicerol é um substrato para a gliconeogênese. Os ácidos graxos são transportados ligados à albumina sérica; são captados pela maioria dos tecidos (mas não pelo cérebro nem pelos eritrócitos) e esterificados a triacilgliceróis para armazenamento ou oxidados como substratos energéticos. No fígado, o triacilglicerol recém-sintetizado e o triacilglicerol de remanescentes de quilomícrons (ver Figura 25-3) são secretados na circulação na **lipoproteína de densidade muito baixa** (**VLDL**). Esse triacilglicerol tem um destino semelhante ao dos quilomícrons. A oxidação parcial de ácidos graxos no fígado leva à produção de **corpos cetônicos** (**cetogênese**, Capítulo 22). Os corpos cetônicos são exportados para tecidos extra-hepáticos, onde atuam como fonte de energia durante o jejum prolongado e na inanição.

Em nível subcelular, a glicólise ocorre no citosol, e o ciclo do ácido cítrico, nas mitocôndrias

A compartimentalização das vias em compartimentos subcelulares separados ou organelas possibilita a integração e a regulação do metabolismo. Nem todas as vias têm igual importância em todas as células. A **Figura 16-7** ilustra a compartimentalização subcelular das vias metabólicas em uma célula do parênquima hepático.

O papel central da **mitocôndria** é imediatamente evidente, visto que ela atua como foco do metabolismo dos carboidratos,

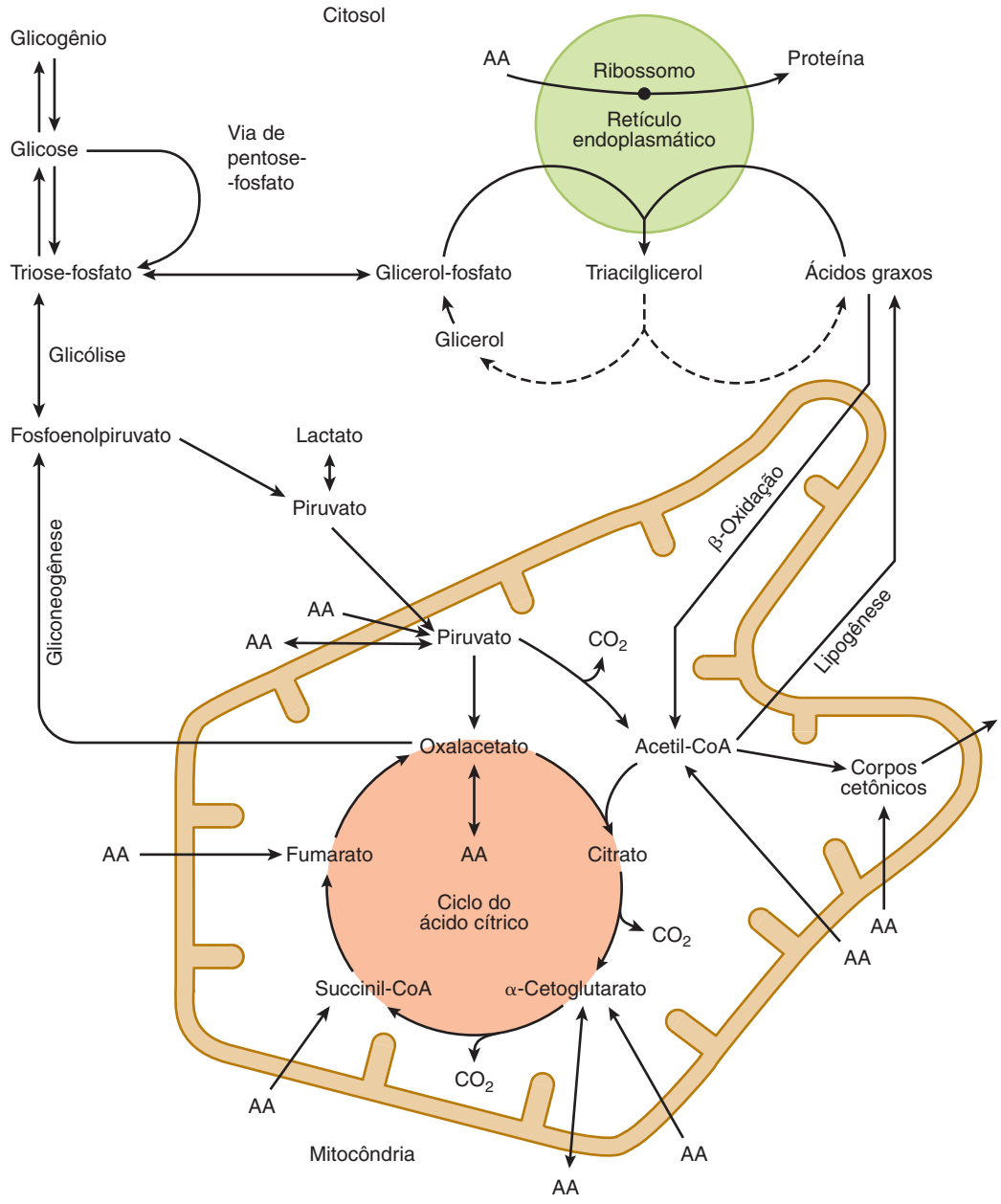


FIGURA 16-7 Localização intracelular e visão geral das principais vias metabólicas em uma célula do parênquima hepático. (AA →, metabolismo de um ou mais aminoácidos essenciais; AA ↔ metabolismo de um ou mais aminoácidos não essenciais.)

lipídeos e aminoácidos. Contém as enzimas do ciclo do ácido cítrico (Capítulo 17), a β-oxidação dos ácidos graxos e a cetogênese (Capítulo 22), bem como a cadeia respiratória e a ATP-sintase (Capítulo 13).

A glicólise (Capítulo 18), a via das pentoses-fosfato (Capítulo 21) e a síntese de ácidos graxos (Capítulo 23) ocorrem no citosol. Na gliconeogênese (Capítulo 20), substratos como o lactato e o piruvato, que são formados no citosol, entram na mitocôndria para produzir **oxalacetato** como precursor para a síntese de glicose no citosol.

As membranas do **retículo endoplasmático** contêm o sistema enzimático para a **síntese de triacilgliceróis** (Capítulo 24), e os **ribossomos** são responsáveis pela **síntese de proteínas** (Capítulo 37).

O FLUXO DE METABÓLITOS POR MEIO DAS VIAS METABÓLICAS DEVE SER REGULADO DE MODO ORGANIZADO

A regulação do fluxo global por uma via é importante para assegurar um suprimento apropriado dos produtos dessa via. É obtida pelo controle de uma ou mais reações essenciais da via, catalisada por **enzimas reguladoras**. Os fatores físico-químicos que controlam a velocidade de uma reação catalisada por enzima, como a concentração de substrato, são de suma importância no controle da velocidade global de uma via metabólica (Capítulo 9).

As reações que não estão em equilíbrio constituem pontos de controle potenciais

Em uma reação em equilíbrio, as reações para diante e reversa ocorrem em velocidades iguais, e, portanto, não existe nenhum fluxo efetivo em qualquer direção.

$$A \leftrightarrow B \leftrightarrow C \leftrightarrow D$$

In vivo, em condições "de equilíbrio dinâmico", existe um fluxo efetivo da esquerda para a direita, pois ocorre um suprimento contínuo de A e remoção de D. Na prática, existem normalmente uma ou mais reações **que não estão em equilíbrio** em uma via metabólica, em que os reagentes estão presentes em concentrações que estão longe do equilíbrio. Na tentativa de alcançar o equilíbrio, ocorrem grandes perdas de energia livre, tornando esse tipo de reação essencialmente irreversível.

$$A \leftrightarrow B \xrightarrow{\text{Calor}} C \leftrightarrow D$$

Essa via apresenta tanto fluxo quanto direção. As enzimas que catalisam as reações fora de equilíbrio estão geralmente presentes em baixas concentrações e sujeitas a uma variedade de mecanismos reguladores. Entretanto, muitas reações nas vias metabólicas não podem ser classificadas como em equilíbrio ou fora de equilíbrio, situando-se em algum ponto entre esses dois extremos.

A reação de geração de fluxo é a primeira reação em uma via saturada com substrato

Pode ser identificada como uma reação que não está em equilíbrio, em que a K_m da enzima é consideravelmente menor do que a concentração normal do substrato. A primeira reação na glicólise, que é catalisada pela hexoquinase (Figura 18-2), é uma etapa de geração de fluxo, visto que o valor de K_m para a glicose, de 0,05 mmol/L, é bem inferior ao nível normal de glicemia de 5 mmol/L. As reações posteriores controlam, então, a velocidade de fluxo pela via.

OS MECANISMOS ALOSTÉRICOS E HORMONAIS SÃO IMPORTANTES NO CONTROLE METABÓLICO DAS REAÇÕES CATALISADAS POR ENZIMAS

A **Figura 16-8** mostra uma via metabólica hipotética, em que as reações A ↔ B e C ↔ D são reações em equilíbrio, enquanto B → C é uma reação que não está em equilíbrio. O fluxo por esse tipo de via pode ser regulado pela disponibilidade do substrato A. Isso depende de seu suprimento a partir do sangue, o qual, por sua vez, depende da ingestão de alimento ou de reações-chave que libe-

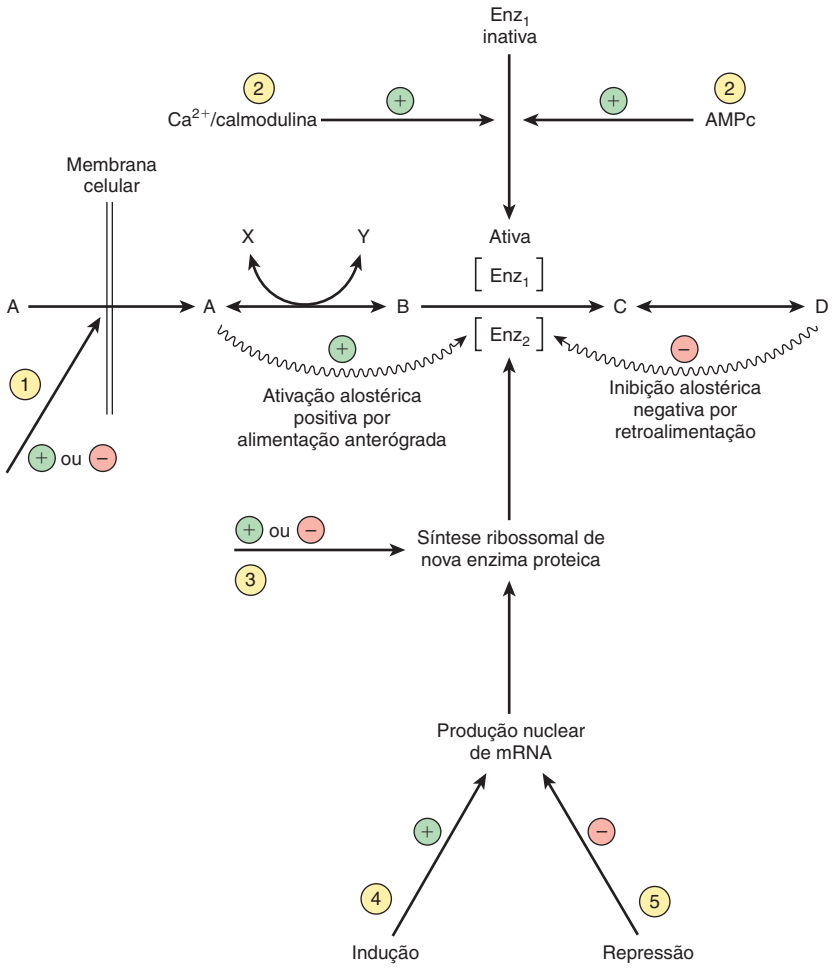


FIGURA 16-8 Mecanismos de controle de uma reação catalisada por enzima. Os números dentro de círculos indicam os possíveis locais de ação de hormônios: ① alteração da permeabilidade da membrana; ② conversão de uma enzima inativa em ativa, geralmente envolvendo reações de fosforilação/desfosforilação; ③ alteração da velocidade de tradução do mRNA em nível ribossomal; ④ indução da formação de novo mRNA; e ⑤ repressão da formação de mRNA. ① e ② são rápidos, enquanto ③ à ⑤ são formas mais lentas de regular a atividade enzimática.

ram substratos das reservas teciduais na corrente sanguínea, como, por exemplo, a glicogênio fosforilase no fígado (Figura 19-1) e a lipase hormônio-sensível no tecido adiposo (Figura 25-8). Depende ainda do transporte do substrato A para dentro da célula. O fluxo também é determinado pela remoção do produto final D e pela disponibilidade de cossubstratos ou cofatores representados por X e Y. As enzimas que catalisam reações que não estão em equilíbrio são, com frequência, proteínas alostéricas sujeitas às ações rápidas de controle de "retroalimentação" ou "alimentação anterógrada" por **modificadores alostéricos**, em resposta imediata às necessidades da célula (Capítulo 9). Com frequência, o produto final de uma via de biossíntese inibe a enzima que catalisa a primeira reação da via. Outros mecanismos de controle dependem da ação dos **hormônios** que respondem às necessidades do organismo como um todo; podem atuar rapidamente ao modificar a atividade das moléculas existentes de enzimas, ou lentamente ao alterar a velocidade de síntese das enzimas (ver Capítulo 42).

MUITOS COMBUSTÍVEIS METABÓLICOS SÃO INTERCONVERSÍVEIS

Os carboidratos em quantidades acima das necessárias para o metabolismo de produção imediata de energia e formação das reservas de glicogênio no músculo e no fígado podem ser prontamente utilizados para a síntese de ácidos graxos e, portanto, de triacilglicerol tanto no tecido adiposo quanto no fígado (a partir do qual é exportado em lipoproteínas de densidade muito baixa). A importância da lipogênese nos seres humanos ainda não foi esclarecida; nos países ocidentais, a gordura dos alimentos fornece 35 a 45% do aporte energético, ao passo que, nos países menos desenvolvidos, onde os carboidratos podem representar 60 a 75% do aporte energético, a ingestão total de alimento é tão baixa que existe pouco excesso disponível para a via da lipogênese. Uma alta ingestão de gordura inibe a lipogênese no tecido adiposo e no fígado.

Os ácidos graxos (e os corpos cetônicos formados a partir deles) não podem ser utilizados para a síntese de glicose. A reação da piruvato-desidrogenase, que forma acetil-CoA, é irreversível, e, para cada unidade de dois carbonos da acetil-CoA que entra no ciclo do ácido cítrico, há uma perda de dois átomos de carbono na forma de dióxido de carbono antes que o oxalacetato seja novamente formado. Isso significa que a acetil-CoA (e, portanto, qualquer substrato que a produza) nunca pode ser usada na gliconeogênese. Os ácidos graxos (relativamente raros) com número ímpar de átomos de carbono produzem propionil-CoA como produto do ciclo final da β-oxidação, podendo ser um substrato para a gliconeogênese, assim como o glicerol liberado pela lipólise das reservas de triacilgliceróis do tecido adiposo.

A maior parte dos aminoácidos em quantidades acima das necessárias para a síntese de proteínas (que provêm da alimentação ou da renovação das proteínas teciduais) produz piruvato ou intermediários de quatro e de cinco carbonos do ciclo do ácido cítrico (Capítulo 29). O piruvato pode ser carboxilado a oxalacetato, que constitui o principal substrato para a gliconeogênese, e os outros intermediários do ciclo também resultam em um aumento efetivo na formação de oxalacetato, que, em seguida, torna-se disponível para a gliconeogênese. Esses aminoácidos são classificados como **glicogênicos**. Dois aminoácidos (lisina e leucina) produzem apenas acetil-CoA na oxidação e, assim, não podem ser utilizados para a gliconeogênese, enquanto quatro outros (i.e., fenilalanina, tirosina, triptofano e isoleucina) dão origem à acetil-CoA e a intermediários que podem ser usados na gliconeogênese. Esses aminoácidos que dão origem à acetil-CoA são designados como **cetogênicos**, visto que, durante o jejum prolongado e na inanição, grande parte da acetil-CoA é utilizada para a síntese de corpos cetônicos no fígado.

HÁ UM SUPRIMENTO DE COMBUSTÍVEIS METABÓLICOS TANTO NO ESTADO ALIMENTADO QUANTO NO ESTADO DE JEJUM

A glicose é sempre necessária para o sistema nervoso central e os eritrócitos

Os eritrócitos carecem de mitocôndrias e, portanto, sempre dependem totalmente da glicólise (anaeróbia) e da via das pentoses-fosfato. O cérebro pode metabolizar corpos cetônicos para suprir cerca de 20% de suas necessidades energéticas; o restante deve ser fornecido pela glicose. As alterações metabólicas que ocorrem no estado de jejum e na inanição são consequências da necessidade de preservar a glicose e as reservas limitadas de glicogênio no fígado e no músculo para uso pelo cérebro e pelos eritrócitos, bem como de assegurar o suprimento de substratos energéticos metabólicos alternativos para outros tecidos. Durante a gravidez, o feto necessita de uma quantidade significativa de glicose, assim como a síntese de lactose na lactação (**Figura 16-9**).

No estado alimentado, ocorre acúmulo de reservas de combustíveis metabólicos

Durante várias horas após uma refeição, enquanto os produtos da digestão estão sendo absorvidos, ocorre um suprimento abundante de combustíveis metabólicos. Nessas condições, a glicose constitui a principal fonte de energia para a oxidação na maioria dos tecidos; isso é observado na forma de aumento do quociente respiratório (a razão entre dióxido de carbono produzido e oxigênio consumido) de cerca de 0,8 no estado de jejum para quase 1 (**Tabela 16-1**).

A captação de glicose no músculo e no tecido adiposo é controlada pela **insulina**, que é secretada pelas células β das ilhotas do pâncreas em resposta a uma concentração aumentada de glicose no sangue porta. No estado de jejum, o transportador de glicose do músculo e do tecido adiposo (GLUT-4) encontra-se em vesículas intracelulares. Uma resposta inicial à insulina consiste na migração dessas vesículas para a superfície celular, onde se fundem com a membrana plasmática, expondo os transportadores ativos de glicose. Esses tecidos sensíveis à insulina só captam a glicose da corrente sanguínea em qualquer quantidade significativa na presença do hormônio. À medida que a secreção de insulina declina no estado de jejum, os receptores são novamente internalizados, reduzindo a captação de glicose. Todavia, no músculo esquelético, o aumento na concentração citoplasmática de íons cálcio em resposta à estimulação nervosa provoca a

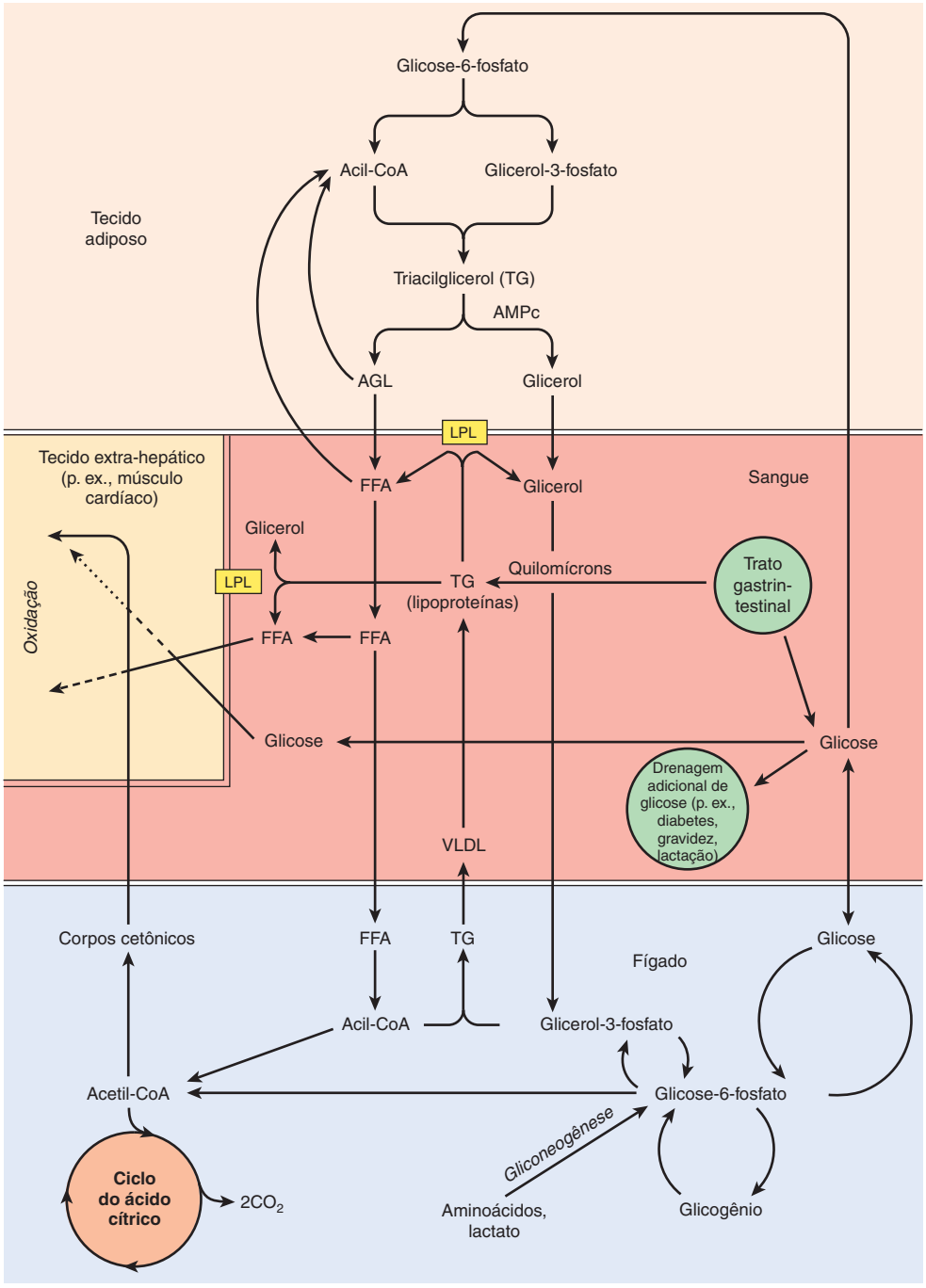


FIGURA 16-9 Inter-relações metabólicas entre o tecido adiposo, o fígado e os tecidos extra-hepáticos. Nos tecidos como o coração, os combustíveis metabólicos são oxidados na seguinte ordem de preferência; corpos cetônicos > ácidos graxos > glicose. (AGL, ácido graxos livres; LPL, lipase lipoproteica; VLDL, lipoproteínas de densidade muito baixa.)

TABELA 16-1 Produção de energia, consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono na oxidação de substratos energéticos metabólicos

	Produção de energia (kJ/g)	O_2 consumido (L/g)	CO_2 produzido (L/g)	RQ (CO_2 produzido/ O_2 consumido)	Energia (kJ)/L O_2
Carboidratos	16	0,829	0,829	1,00	20
Proteínas	17	0,966	0,782	0,81	20
Lipídeos	37	2.016	1,427	0,71	20
Álcool	29	1,429	0,966	0,66	20

migração das vesículas para a superfície celular e a exposição dos transportadores ativos de glicose, independentemente da presença ou ausência de estimulação significativa da insulina.

A captação de glicose no fígado é independente da insulina, porém o fígado possui uma isoenzima da hexoquinase (glicoquinase) com alto valor de K_m, de modo que, à medida que a concentração de glicose que entra no fígado aumenta, o mesmo ocorre com a velocidade de síntese de glicose-6-fosfato. Isso representa um excesso em relação à demanda hepática para o metabolismo de produção de energia, e esse excesso é usado principalmente na síntese de **glicogênio**. Tanto no fígado quanto no músculo esquelético, a insulina atua para estimular a glicogênio sintetase e inibir a glicogênio-fosforilase. Parte da glicose adicional que entra no fígado também pode ser utilizada para a lipogênese e, portanto, para a síntese de triacilglicerol. No tecido adiposo, a insulina estimula a captação de glicose, a sua conversão em ácidos graxos e esterificação a triacilglicerol, e também inibe a lipólise intracelular e a liberação de ácidos graxos livres.

Os produtos da digestão dos lipídeos entram na circulação como **quilomícrons**, as maiores das lipoproteínas plasmáticas, particularmente ricas em triacilglicerol (ver Capítulo 25). No tecido adiposo e no músculo esquelético, a lipase lipoproteica extracelular é sintetizada e ativada em resposta à insulina; os ácidos graxos não esterificados resultantes são captados, em grande parte, pelo tecido e usados para a síntese de triacilglicerol, enquanto o glicerol permanece na corrente sanguínea e é captado pelo fígado e utilizado para a gliconeogênese e a síntese de glicogênio ou lipogênese. Os ácidos graxos que permanecem na corrente sanguínea são captados pelo fígado e reesterificados. Os remanescentes de quilomícrons com depleção de lipídeos são depurados pelo fígado, e o triacilglicerol remanescente é exportado com aquele sintetizado no fígado na **lipoproteína de densidade muito baixa**.

Em condições normais, a velocidade do catabolismo proteico tecidual é mais ou menos constante durante o dia; apenas na **caquexia** associada ao câncer avançado e a outras doenças é que ocorre uma velocidade aumentada de catabolismo proteico. Ocorre catabolismo efetivo de proteínas no estado de jejum, e observa-se uma síntese efetiva de proteínas no estado alimentado, quando a velocidade de síntese aumenta em 20 a 25%. A velocidade aumentada de síntese de proteínas em resposta à maior disponibilidade de aminoácidos e combustível metabólico representa, novamente, uma resposta à ação da insulina. A síntese de proteínas é um processo que consome energia; pode ser responsável por até 20% do gasto energético em repouso após uma refeição, mas por apenas 9% no estado de jejum.

As reservas de combustíveis metabólicos são mobilizadas no estado de jejum

Observa-se uma pequena queda da glicose plasmática no estado de jejum, e também pouca alteração à medida que o jejum se prolonga até o estado de inanição. Os ácidos graxos livres plasmáticos aumentam durante o jejum; todavia, em seguida, ocorre pouca elevação adicional na inanição. Quando o jejum é prolongado, a concentração plasmática de corpos cetônicos (acetoacetato e 3-hidroxibutirato) aumenta acentuadamente (**Tabela 16-2**, **Figura 16-10**).

TABELA 16-2 Concentração plasmática de substratos energéticos metabólicos (mmol/L) no estado alimentado e no jejum

	Alimentado	40 h de jejum	7 dias de inanição
Glicose	5,5	3,6	3,5
Ácidos graxos livres	0,30	1,15	1,19
Corpos cetônicos	Quantidade desprezível	2,9	4,5

No estado de jejum, à medida que a concentração de glicose no sangue porta cai, a secreção de insulina diminui, e o músculo esquelético e o tecido adiposo captam menor quantidade de glicose. O aumento na secreção de **glucagon** pelas células α do pâncreas inibe a glicogênio sintetase e ativa a glicogênio fosforilase no fígado. A glicose-6-fosfato resultante é hidrolisada pela glicose-6-fosfatase, e a glicose é liberada na corrente sanguínea para uso pelo cérebro e pelos eritrócitos.

O glicogênio muscular não pode contribuir diretamente para a glicose plasmática, pois o músculo carece de glicose-6-fosfatase, e a principal finalidade do glicogênio muscular é a de fornecer uma fonte de glicose-6-fosfato para o metabolismo de produção de energia no próprio músculo. Todavia, a acetil-CoA formada pela oxidação dos ácidos graxos no músculo inibe a piruvato-desidrogenase, levando a um acúmulo de piruvato. A maior parte deste sofre transaminação em alanina, à custa dos aminoácidos que provêm da degradação da proteína muscular. A alanina e grande parte dos cetoácidos resultantes dessa transaminação são exportadas do músculo e captadas pelo fígado, onde a alanina é transaminada para gerar piruvato. Os aminoácidos

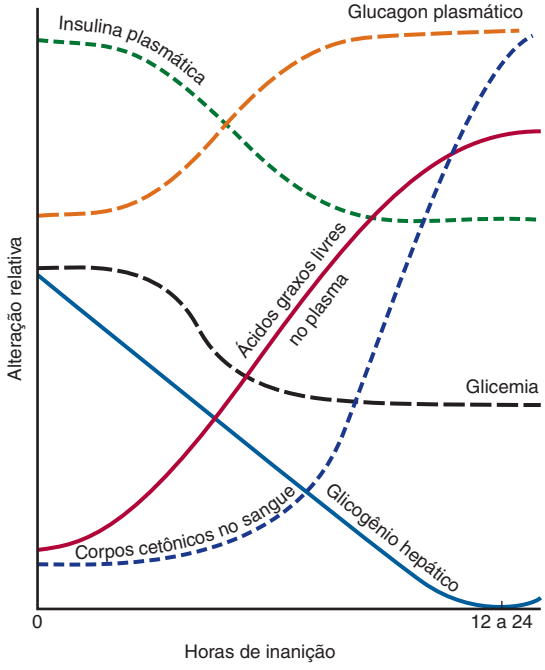


FIGURA 16-10 Alterações relativas nos parâmetros metabólicos durante o início da inanição.

resultantes são exportados, em grande parte, de volta ao músculo, a fim de fornecer grupos amino para a formação de mais alanina, enquanto o piruvato é um importante substrato para a gliconeogênese no fígado.

No tecido adiposo, a diminuição da insulina e o aumento do glucagon resultam em inibição da lipogênese, inativação e internalização da lipase lipoproteica e ativação da lipase hormônio-sensível intracelular (Capítulo 25). Isso leva à liberação, pelo tecido adiposo, de quantidades aumentadas de glicerol (que é um substrato para a gliconeogênese no fígado) e de ácidos graxos livres, que são utilizados pelo fígado, coração e músculo esquelético como seus substratos energéticos metabólicos preferidos, poupando, assim, a glicose.

Apesar de o músculo captar e metabolizar preferencialmente ácidos graxos livres no estado de jejum, isso não pode suprir todas as necessidades energéticas pela β-oxidação. Em contrapartida, o fígado apresenta maior capacidade de β-oxidação do que a necessária para satisfazer suas próprias necessidades energéticas, e, à medida que o jejum se torna mais prolongado, o fígado forma mais acetil-CoA do que a que pode ser oxidada. Essa acetil-CoA é utilizada na síntese de **corpos cetônicos** (Capítulo 22), que constituem os principais combustíveis metabólicos para o músculo esquelético e o músculo cardíaco, podendo suprir até 20% das necessidades energéticas do cérebro. Na inanição prolongada, a glicose pode representar menos de 10% do metabolismo produtor de energia de todo o organismo.

Se não houvesse nenhuma outra fonte de glicose, o glicogênio hepático e muscular seria esgotado após cerca de 18 h de jejum. À medida que o jejum se torna mais prolongado, uma quantidade crescente dos aminoácidos liberados em consequência do catabolismo das proteínas é usada no fígado e nos rins para a gliconeogênese (**Tabela 16-3**).

ASPECTOS CLÍNICOS

Na inanição prolongada, quando ocorre depleção das reservas do tecido adiposo, observa-se um considerável aumento na velocidade efetiva de catabolismo das proteínas para fornecer aminoácidos, não apenas como substratos para a gliconeogênese, mas também como principal combustível metabólico de todos os tecidos. Ocorre morte quando as proteínas teciduais essenciais são catabolizadas e não são substituídas. Em pacientes com **caquexia**, em consequência da liberação de **citocinas** em resposta a tumores e a várias outras condições patológicas, ocorre aumento na velocidade de catabolismo das proteínas teciduais,

TABELA 16-3 Resumo das principais características metabólicas dos principais órgãos

Órgão	Principais vias	Principais substratos	Principais produtos exportados	Enzimas especializadas
Fígado	Glicólise, gliconeogênese, lipogênese, β-oxidação, ciclo do ácido cítrico, cetogênese, metabolismo das lipoproteínas, metabolismo de fármacos, síntese de sais biliares, ureia, ácido úrico, colesterol, proteínas plasmáticas	Ácidos graxos livres, glicose (no estado alimentado), lactato, glicerol, frutose, aminoácidos, álcool	Glicose, triacilglicerol nas VLDL,[1] corpos cetônicos, ureia, ácido úrico, sais biliares, colesterol, proteínas plasmáticas	Glicoquinase, glicose-6-fosfatase, glicerol quinase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase, frutoquinase, arginase, HMG CoA-sintase, HMG CoA-liase, álcool-desidrogenase
Cérebro	Glicólise, ciclo do ácido cítrico, metabolismo de aminoácidos, síntese de neurotransmissores	Glicose, aminoácidos, corpos cetônicos na inanição prolongada	Lactato, produtos finais do metabolismo dos neurotransmissores	Aquelas para a síntese e o catabolismo dos neurotransmissores
Coração	β-oxidação e ciclo do ácido cítrico	Corpos cetônicos, ácidos graxos livres, lactato, quilomícrons e triacilglicerol das VLDL, alguma glicose	–	Lipase lipoproteica, cadeia de transporte de elétrons muito ativa
Tecido adiposo	Lipogênese, esterificação de ácidos graxos, lipólise (no jejum)	Glicose, quilomícrons e triacilglicerol de VLDL	Ácidos graxos livres, glicerol	Lipase lipoproteica, lipase hormônio-sensível, enzimas da via das pentoses-fosfato
Contração muscular rápida	Glicólise	Glicose, glicogênio	Lactato (alanina e cetoácidos em jejum)	–
Contração muscular lenta	β-oxidação e ciclo do ácido cítrico	Corpos cetônicos, quilomícrons e triacilglicerol das VLDL	–	Lipase lipoproteica, cadeia de transporte de elétrons muito ativa
Rim	Gliconeogênese	Ácidos graxos livres, lactato, glicerol, glicose	Glicose	Glicerol-quinase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase
Eritrócitos	Glicólise anaeróbia, via das pentoses-fosfato	Glicose	Lactato	Hemoglobina, enzimas da via das pentoses-fosfato

[1]VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa.

bem como uma elevação considerável da taxa metabólica, de modo que esses indivíduos encontram-se em um estado de inanição avançada. Mais uma vez, ocorre morte quando as proteínas teciduais essenciais são catabolizadas e não são substituídas.

A alta demanda de glicose pelo feto e para a síntese de lactose na lactação pode levar ao desenvolvimento de cetose. Isso pode se manifestar como cetose discreta com hipoglicemia nos seres humanos; nas vacas em lactação e nas ovelhas com gestação gemelar, podem ocorrer cetoacidose muito pronunciada e hipoglicemia profunda.

No **diabetes melito** tipo 1 inadequadamente controlado, os pacientes podem desenvolver hipoglicemia, em parte como consequência da falta de insulina para estimular a captação e a utilização da glicose e em parte pelo fato de que, na ausência de insulina, ocorre elevação da gliconeogênese a partir dos aminoácidos no fígado. Ao mesmo tempo, a falta de insulina resulta em aumento da lipólise no tecido adiposo, e os ácidos graxos livres resultantes são substratos para a cetogênese no fígado.

A utilização desses corpos cetônicos no músculo (e em outros tecidos) pode estar comprometida devido à falta de oxalacetato (todos os tecidos têm necessidade de algum metabolismo da glicose para manter uma quantidade adequada de oxalacetato para a atividade do ciclo do ácido cítrico). No diabetes não controlado, a cetose pode ser grave o suficiente para resultar em acidose pronunciada (**cetoacidose**), visto que o acetoacetato e o 3-hidroxibutirato são ácidos relativamente fortes. O coma resulta tanto da acidose quanto da osmolalidade consideravelmente aumentada do líquido extracelular (principalmente em consequência da hiperglicemia e diurese em decorrência da excreção de glicose e corpos cetônicos na urina).

RESUMO

- Os produtos da digestão fornecem aos tecidos as unidades básicas de construção para a biossíntese de moléculas complexas, bem como os combustíveis para os processos metabólicos.
- Quase todos os produtos da digestão de carboidratos, lipídeos e proteínas são metabolizados a um metabólito comum, a acetil-CoA, antes da oxidação a CO_2 no ciclo do ácido cítrico.
- A acetil-CoA também é o precursor para a síntese de ácidos graxos de cadeia longa, esteroides (incluindo o colesterol) e corpos cetônicos.
- A glicose fornece os esqueletos de carbono para o glicerol dos triacilgliceróis e para os aminoácidos não essenciais.
- Os produtos hidrossolúveis da digestão são transportados diretamente até o fígado pela veia porta do fígado. O fígado regula os níveis de glicemia e a concentração de aminoácidos no sangue. Os lipídeos e os produtos lipossolúveis da digestão entram na corrente sanguínea a partir do sistema linfático, e o fígado procede à depuração dos remanescentes após captação dos ácidos graxos pelos tecidos extra-hepáticos.
- As vias são compartimentalizadas dentro da célula. A glicólise, a glicogênese, a glicogenólise, a via das pentoses-fosfato e a lipogênese ocorrem no citosol. As mitocôndrias contêm as enzimas do ciclo do ácido cítrico, da β-oxidação dos ácidos graxos e cadeia respiratória e ATP-sintase. As membranas do retículo endoplasmático contêm as enzimas para vários outros processos, incluindo a síntese de triacilglicerol e o metabolismo de fármacos.
- As vias metabólicas são reguladas por mecanismos rápidos que afetam a atividade das enzimas existentes, isto é, pela modificação alostérica e covalente (frequentemente em resposta à ação hormonal), bem como por mecanismos lentos que afetam a síntese das enzimas.
- Os carboidratos e os aminoácidos da alimentação, quando presentes em quantidades acima das necessárias, podem ser usados para a síntese de ácidos graxos e, portanto, de triacilgliceróis.
- No jejum e na inanição, a glicose deve ser fornecida ao cérebro e aos eritrócitos; no estado inicial de jejum, essa glicose é suprida pelas reservas de glicogênio. Para poupar a glicose, o músculo e outros tecidos não captam a glicose quando a secreção de insulina está baixa; eles utilizam ácidos graxos (e, posteriormente, corpos cetônicos) como seus substratos energéticos preferidos.
- O tecido adiposo libera ácidos graxos livres no estado de jejum. No jejum prolongado e na inanição, eles são usados pelo fígado para a síntese de corpos cetônicos, que são exportados para fornecer o principal substrato energético ao músculo.
- Os aminoácidos que se originam da alimentação ou da renovação das proteínas teciduais podem ser usados, em sua maioria, para a gliconeogênese, assim como o glicerol dos triacilgliceróis.
- Nem os ácidos graxos, provenientes da alimentação ou da lipólise do triacilglicerol do tecido adiposo, nem os corpos cetônicos, formados a partir de ácidos graxos no estado de jejum, podem fornecer substratos para a gliconeogênese.

REFERÊNCIAS

Bender DA: *Introduction to Nutrition and Metabolism,* 4th ed. CRC Press, 2007.

Brosnan JT: Comments on the metabolic needs for glucose and the role of gluconeogenesis. Eur J Clin Nutr 1999;53:S107–S111.

Frayn KN: Integration of substrate flow in vivo: some insights into metabolic control. Clin Nutr 1997;16:277–282.

Frayn KN: *Metabolic Regulation: A Human Perspective,* 3rd ed. Wiley-Blackwell, 2010.

Zierler K: Whole body metabolism of glucose. Am J Physiol 1999;276:E409–E426.

CAPÍTULO 17

O Ciclo do Ácido Cítrico: O Catabolismo da Acetil-CoA

David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever as reações do ciclo do ácido cítrico e as reações que levam à produção de equivalentes redutores, os quais são oxidados na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial para a produção de ATP.
- Explicar a importância das vitaminas no ciclo do ácido cítrico.
- Demonstrar como o ciclo do ácido cítrico fornece uma via tanto para o catabolismo de aminoácidos quanto para a sua síntese.
- Delinear as principais vias anapleróticas que possibilitam a reposição de intermediários do ciclo do ácido cítrico e como a retirada do oxalacetato para a gliconeogênese é controlada.
- Referir o papel do ciclo do ácido cítrico na síntese de ácidos graxos.
- Elucidar como a atividade do ciclo do ácido cítrico é controlada pela disponibilidade de cofatores oxidados.
- Relatar como a hiperamonemia pode levar à perda da consciência.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

O ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs, ciclo do ácido tricarboxílico) é uma sequência de reações que ocorre nas mitocôndrias que oxida a fração acetil da acetil-CoA e reduz coenzimas que são novamente oxidadas pela cadeia de transporte de elétrons, ligada à formação de ATP.

O ciclo do ácido cítrico é a via final comum para a oxidação dos carboidratos, dos lipídeos e das proteínas, visto que a glicose, os ácidos graxos e a maior parte dos aminoácidos são metabolizados a acetil-CoA ou a intermediários do ciclo. O ciclo do ácido cítrico também desempenha um papel central na gliconeogênese, na lipogênese e na interconversão de aminoácidos. Muitos desses processos ocorrem na maioria dos tecidos, porém o fígado é o único tecido no qual todos ocorrem em grau significativo. Assim, as repercussões são profundas quando, por exemplo, numerosas células hepáticas são lesionadas, conforme observado na **hepatite** aguda, ou são substituídas por tecido conectivo (como na **cirrose**). Os poucos defeitos genéticos das enzimas do ciclo do ácido cítrico que já foram descritos estão associados à ocorrência de lesão neurológica grave, em consequência de comprometimento considerável na formação de ATP no sistema nervoso central.

A hiperamonemia, como a que ocorre na doença hepática avançada, leva à perda da consciência, coma e convulsões, em consequência da atividade reduzida do ciclo do ácido cítrico, resultando em diminuição na formação de ATP. A amônia causa depleção dos intermediários do ciclo do ácido cítrico (ao retirar o α-cetoglutarato para a formação de glutamato e glutamina) e também inibe a descarboxilação oxidativa do α-cetoglutarato.

O CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO FORNECE SUBSTRATOS PARA A CADEIA RESPIRATÓRIA

O ciclo começa com a reação entre a fração acetil da acetil-CoA e o oxalacetato, um ácido dicarboxílico de quatro carbonos, formando um ácido tricarboxílico de seis carbonos, o citrato. Nas reações subsequentes, são liberadas duas moléculas de CO_2, e o oxalacetato é regenerado (**Figura 17-1**). Apenas uma pequena quantidade de oxalacetato é necessária para a oxidação de uma grande quantidade de acetil-CoA; pode-se considerar que o oxalacetato desempenha um **papel catalítico**, já que é regenerado no final do ciclo.

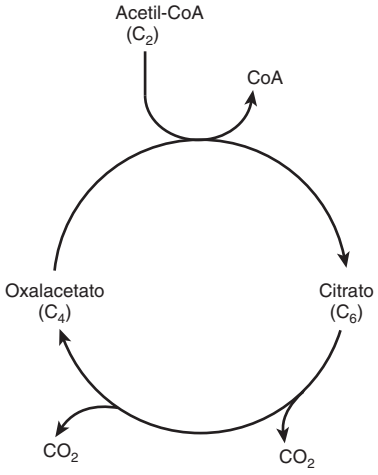


FIGURA 17-1 O ciclo do ácido cítrico, ilustrando o papel catalítico do oxalacetato.

O ciclo do ácido cítrico é parte integrante do processo pelo qual a energia livre liberada durante a oxidação de combustíveis torna-se disponível. Durante a oxidação de acetil-CoA, as coenzimas são reduzidas e subsequentemente reoxidadas na cadeia respiratória, em um processo ligado à formação de ATP (fosforilação oxidativa, **Figura 17-2**; ver também Capítulo 13). Esse processo é **aeróbio**, exigindo a presença de oxigênio como oxidante final das coenzimas reduzidas. As enzimas do ciclo do ácido cítrico localizam-se na **matriz mitocondrial**, na forma livre ou fixadas à membrana mitocondrial interna e à membrana das cristas, onde são também encontradas as enzimas e coenzimas da cadeia respiratória.

AS REAÇÕES DO CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO LIBERAM EQUIVALENTES REDUTORES E CO_2

A reação inicial entre a acetil-CoA e o oxalacetato para formar citrato é catalisada pela **citrato-sintase**, que forma uma ligação carbono-carbono entre o carbono metila da acetil-CoA e o carbono carbonila do oxalacetato (**Figura 17-3**). A ligação tioéster da citril-CoA resultante é hidrolisado, com liberação de citrato e CoASH—uma reação exotérmica.

O citrato sofre isomerização a isocitrato pela enzima **aconitase** (aconitato hidratase). A reação ocorre em duas etapas: a desidratação a *cis*-aconitato e a reidratação a isocitrato. Embora o citrato seja uma molécula simétrica, a aconitase reage de modo assimétrico com o citrato, de modo que os dois átomos de carbono que são perdidos em reações subsequentes do ciclo não são aqueles que foram acrescentados a partir da acetil-CoA. Esse comportamento assimétrico resulta do processo de **canalização** – a transferência direta do produto da citrato-sintase para o sítio ativo da aconitase, sem necessidade de entrar em solução livre. A canalização possibilita a integração da atividade do ciclo do ácido cítrico com o fornecimento de citrato no citosol como fonte de acetil-CoA para a síntese de ácidos graxos. O citrato só está disponível em solução livre para ser transportado das mitocôndrias até o citosol para a síntese de ácidos graxos, quando a aconitase é inibida pelo acúmulo de seu produto, o isocitrato.

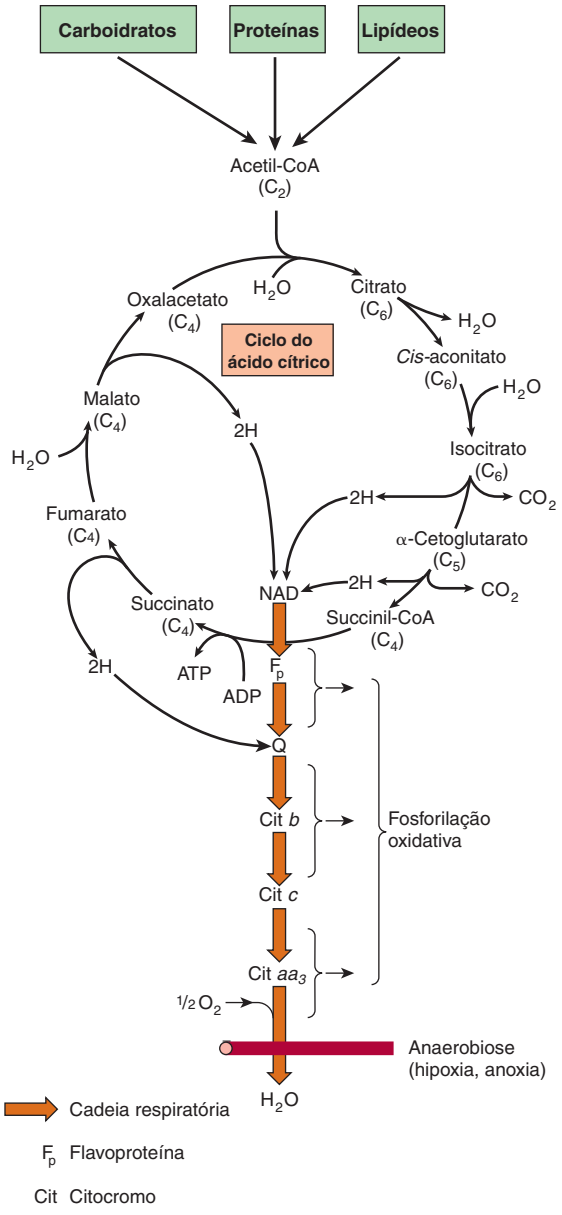


FIGURA 17-2 O ciclo do ácido cítrico: a principal via catabólica da acetil-CoA nos organismos aeróbios. A acetil-CoA, o produto do catabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, é introduzida no ciclo e oxidada a CO_2 com liberação de equivalentes redutores (2H). A oxidação subsequente de 2H na cadeia respiratória leva à fosforilação do ADP em ATP. Para cada volta do ciclo, são geradas nove moléculas de ATP pela fosforilação oxidativa, e surge uma molécula de ATP (ou GTP) em nível de substrato a partir da conversão da succinil-CoA em succinato.

O veneno **fluoracetato** é encontrado em algumas plantas, e o seu consumo pode ser fatal para animais de pastagem. Alguns compostos fluorados empregados como agentes antineoplásicos e substâncias químicas industriais (incluindo pesticidas) são metabo-

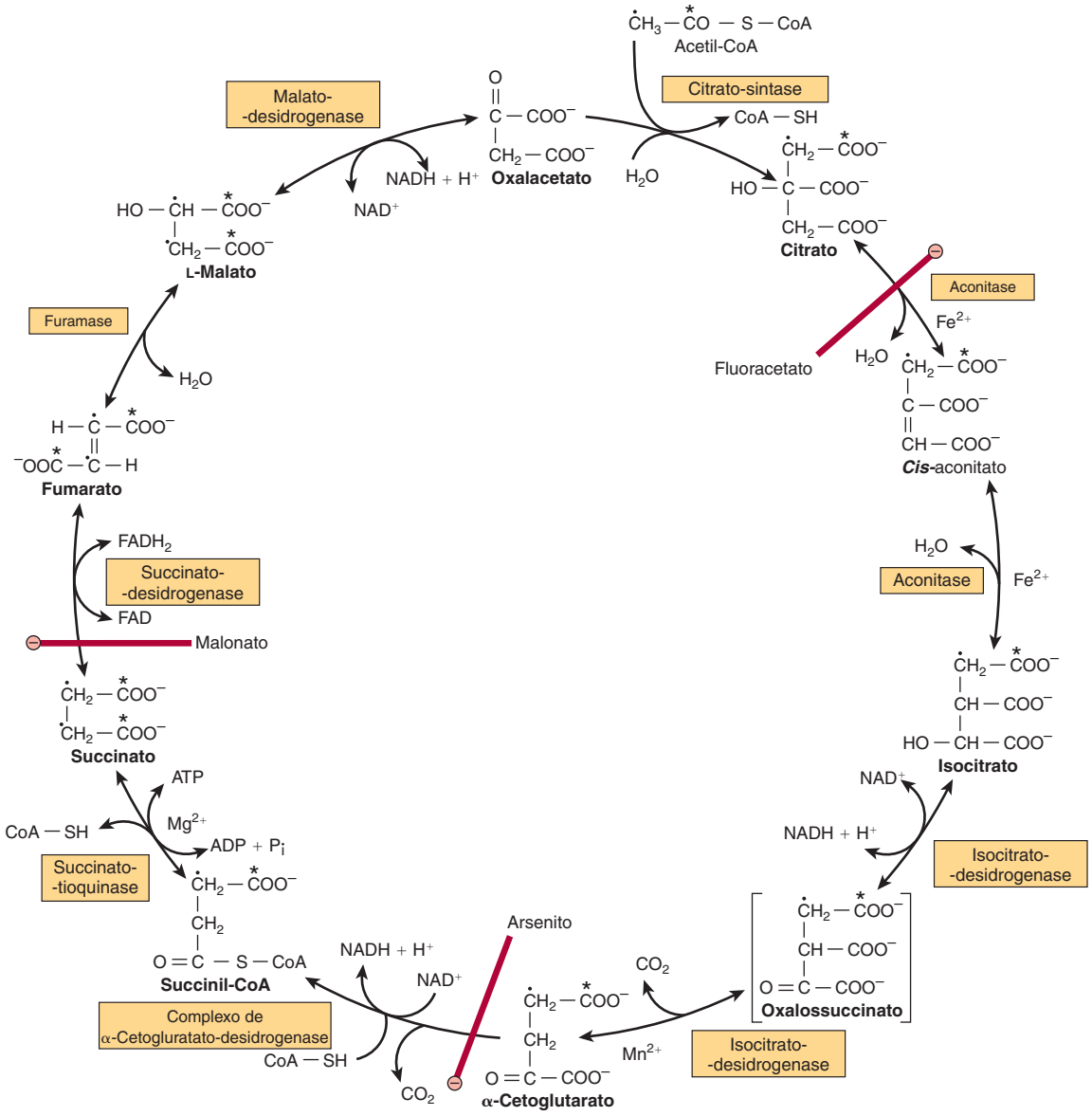


FIGURA 17-3 O ciclo do ácido cítrico (de Krebs). A oxidação de NADH e $FADH_2$ na cadeia respiratória leva à formação de ATP por fosforilação oxidativa. Com a finalidade de acompanhar o trajeto da acetil-CoA ao longo do ciclo, os dois átomos de carbono do radical acetil estão marcados no carbono carboxila (*) e no carbono metila (•). Embora dois átomos de carbono sejam perdidos como CO_2 a cada volta do ciclo, esses átomos não provêm da acetil-CoA que entrou imediatamente no ciclo, mas da parte da molécula de citrato derivada do oxalacetato. Entretanto, ao completar cada volta do ciclo, o oxalacetato regenerado está agora marcado, resultando na liberação do CO_2 marcado durante a segunda volta do ciclo. Como o succinato é um composto simétrico, ocorre "randomização" da marcação nessa etapa, de modo que todos os quatro átomos de carbono do oxalacetato aparecem marcados depois de uma volta do ciclo. Durante a gliconeogênese, parte da marcação do oxalacetato incorpora-se na glicose e no glicogênio (Figura 20-1). Estão indicados os locais de inibição (⊖) pelo fluoracetato, malonato e arsenito.

lizados a fluoracetato. Trata-se de uma substância tóxica, visto que a fluoracetil-CoA condensa-se com o oxalacetato para formar fluorocitrato, que inibe a aconitase, levando ao acúmulo de citrato.

O isocitrato sofre desidrogenação catalisada pela **isocitrato-desidrogenase**, formando, inicialmente, oxalossuccinato, que permanece ligado à enzima e sofre descarboxilação a α-cetoglutarato. A descarboxilação necessita da presença de íons Mg^{2+} ou Mn^{2+}. Existem três isoenzimas da isocitrato-desidrogenase. Uma delas, que utiliza o NAD^+, é encontrada apenas nas mitocôndrias. As outras duas utilizam o $NADP^+$ e são encontradas nas mitocôndrias e no citosol. A oxidação do isocitrato ligada à cadeia respiratória ocorre por meio da enzima dependente de NAD^+.

O α-cetoglutarato sofre **descarboxilação oxidativa**, em uma reação catalisada por um complexo multienzimático semelhante àquele envolvido na descarboxilação oxidativa do piruvato (Figura 18-5). O **complexo da α-cetoglutarato-desidrogenase** requer os mesmos cofatores que o complexo da

piruvato-desidrogenase – tiamina-pirofosfato, lipoato, NAD^+, FAD e CoA – e resulta na formação de succinil-CoA. O equilíbrio dessa reação favorece tanto a formação de succinil-CoA que ela deve ser considerada como fisiologicamente unidirecional. Como no caso da oxidação do piruvato (Capítulo 18), o arsenito inibe a reação, causando acúmulo do substrato, o **α-cetoglutarato.** A presença de amônia em altas concentrações inibe a α-cetoglutarato-desidrogenase.

A succinil-CoA é convertida em succinato pela enzima **succinato-tioquinase** (**succinil-CoA sintetase**). Trata-se do único exemplo de fosforilação em nível de substrato no ciclo do ácido cítrico. Os tecidos onde ocorre gliconeogênese (fígado e rim) contêm duas isoenzimas da succinato-tioquinase, uma específica para o GDP, e a outra, para o ADP. O GTP formado é utilizado na descarboxilação do oxalacetato em fosfoenolpiruvato na gliconeogênese e estabelece uma ligação reguladora entre a atividade do ciclo do ácido cítrico e a retirada de oxalacetato para a gliconeogênese. Os tecidos não gliconeogênicos apresentam apenas a isoenzima que utiliza ADP.

Quando os corpos cetônicos estão sendo metabolizados nos tecidos extra-hepáticos, ocorre uma reação alternativa catalisada pela **succinil-CoA acetoacetato-CoA transferase** (**tioforase**), envolvendo a transferência de CoA da succinil-CoA para o acetoacetato, com formação de acetoacetil-CoA e succinato (Capítulo 22).

O metabolismo subsequente do succinato, que leva à regeneração do oxalacetato, segue a mesma sequência de reações químicas que ocorrem na β-oxidação dos ácidos graxos: desidrogenação para formar uma dupla ligação carbono-carbono, adição de água para formar um grupo hidroxila e desidrogenação adicional para produzir o grupo oxo do oxalacetato.

A primeira reação de desidrogenação, que forma o fumarato, é catalisada pela **succinato-desidrogenase**, que está ligada à superfície interna da membrana mitocondrial interna. A enzima contém FAD e proteína de ferro-enxofre (Fe:S) e reduz diretamente a ubiquinona na cadeia de transporte de elétrons. A **fumarase** (**fumarato-hidratase**) catalisa a adição de água por meio da dupla ligação do fumarato, dando origem ao malato. Em seguida, o malato é convertido em oxalacetato pela **malato-desidrogenase,** uma reação que requer a presença de NAD^+. Embora o equilíbrio dessa reação favoreça fortemente o malato, o fluxo efetivo ocorre em direção ao oxalacetato, devido à remoção contínua de oxalacetato (para formar citrato, como substrato para a gliconeogênese, ou para sofrer transaminação a aspartato) e também devido à reoxidação contínua do NADH.

FORMAM-SE DEZ MOLÉCULAS DE ATP A CADA VOLTA DO CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO

Em consequência das oxidações catalisadas pelas desidrogenases do ciclo do ácido cítrico, são produzidas três moléculas de NADH e uma de $FADH_2$ para cada molécula de acetil-CoA catabolizada em uma volta do ciclo. Esses equivalentes redutores são transferidos para a cadeia respiratória (ver Figura 13-3), onde a reoxidação de cada NADH resulta na formação de cerca de 2,5 moléculas de ATP, e a reoxidação do $FADH_2$, forma cerca de 1,5 moléculas de ATP. Além disso, uma molécula de ATP (ou de GTP) é formada por fosforilação em nível de substrato, catalisada pela succinato-tioquinase.

AS VITAMINAS DESEMPENHAM PAPÉIS ESSENCIAIS NO CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO

Quatro das vitaminas B (Capítulo 44) são essenciais no ciclo do ácido cítrico e, portanto, no metabolismo produtor de energia: (1) a **riboflavina**, na forma de flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD), um cofator para a succinato-desidrogenase; (2) a **niacina**, na forma de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD), o aceptor de elétrons para a isocitrato desidrogenase, a α-cetoglutarato desidrogenase e a malato-desidrogenase; (3) a tiamina (**vitamina B_1**), na forma de tiamina pirofosfato, a coenzima necessária para a descarboxilação na reação da α-cetoglutarato desidrogenase; e (4) o **ácido pantotênico**, como parte da coenzima A, o cofator ligado a resíduos de ácido carboxílico "ativos", como a acetil-CoA e a succinil-CoA.

O CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO DESEMPENHA UM PAPEL FUNDAMENTAL NO METABOLISMO

O ciclo do ácido cítrico não é apenas uma via para a oxidação de unidades de dois carbonos, mas também uma importante via para a interconversão de metabólitos que surgem da **transaminação** e da **desaminação** dos aminoácidos (Capítulos 28 e 29), fornecendo os substratos para a **síntese de aminoácidos** por transaminação (Capítulo 27), bem como para a **gliconeogênese** (Capítulo 20) e a **síntese de ácidos graxos** (Capítulo 23). Em virtude de sua função em processos tanto oxidativos quanto de síntese, o ciclo é **anfibólico** (**Figura 17-4**).

O ciclo do ácido cítrico participa na gliconeogênese, na transaminação e na desaminação

Todos os intermediários do ciclo são potencialmente **glicogênicos**, uma vez que podem dar origem ao oxalacetato e, portanto, à produção efetiva de glicose (no fígado e no rim, os órgãos responsáveis pela gliconeogênese; ver Capítulo 20). A enzima-chave que catalisa a transferência final do ciclo para a gliconeogênese é a **fosfoenolpiruvato carboxiquinase**, que catalisa a descarboxilação do oxalacetato em fosfoenolpiruvato, sendo o GTP doador de fosfato (ver Figura 20-1). O GTP necessário para essa reação é fornecido (no fígado e no rim) pela isoenzima da succinato-tioquinase dependente de GDP. Isso assegura que o oxalacetato não será retirado do ciclo para a gliconeogênese, pois isso levaria à depleção dos intermediários do ciclo do ácido cítrico e, portanto, a uma produção reduzida de ATP.

A transferência final para o ciclo ocorre como resultado de várias reações. Entre as mais importantes dessas reações **anapleróticas**, destaca-se a formação de oxalacetato pela carboxi-

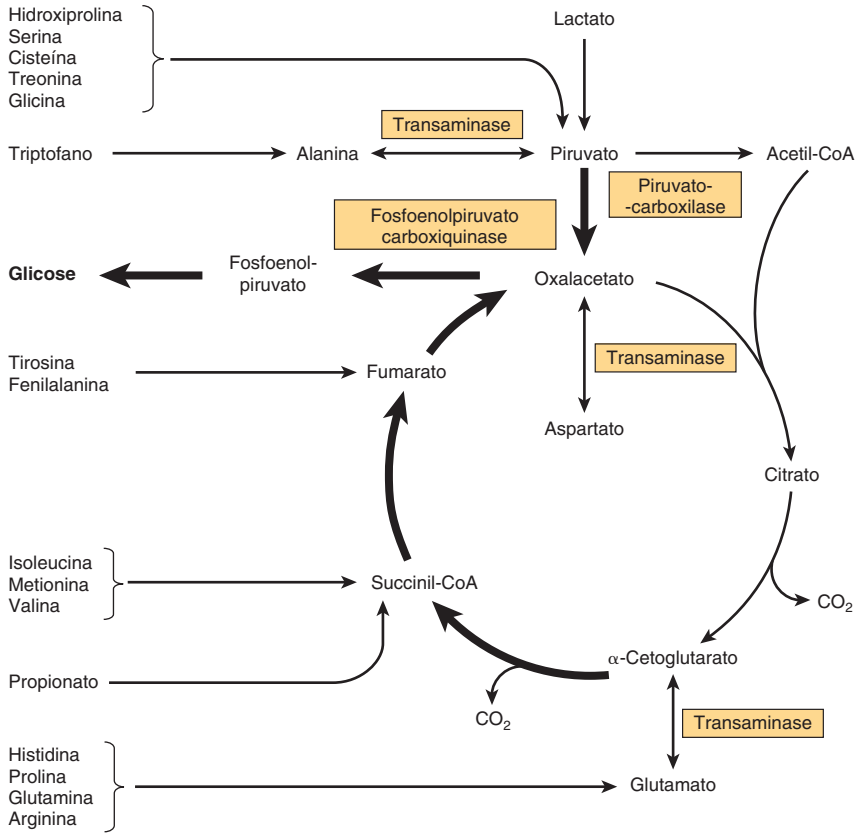


FIGURA 17-4 Participação do ciclo do ácido cítrico na transaminação e gliconeogênese. As setas em negrito indicam a principal via de gliconeogênese.

lação do piruvato, catalisada pela **piruvato-carboxilase**. Essa reação é importante para manter uma concentração adequada de oxalacetato para a reação de condensação com a acetil-CoA. Se houver acúmulo de acetil-CoA, ela irá atuar tanto como ativador alostérico da piruvato-carboxilase quanto como inibidor da piruvato-desidrogenase, assegurando, assim, um suprimento de oxalacetato. O lactato, um importante substrato para a gliconeogênese, entra no ciclo por meio de oxidação a piruvato e, em seguida, carboxilação em oxalacetato. O **glutamato** e a **glutamina** são substratos anapleróticos importantes, pois dão origem ao α-cetoglutarato como resultado das reações catalisadas pela glutaminase e glutamato-desidrogenase. A transaminação do **aspartato** leva diretamente à formação de oxalacetato, e diversos compostos que são metabolizados para produzir **propionil-CoA**, que pode ser carboxilada e isomerizada a succinil-CoA, também são substratos anapleróticos importantes.

As reações catalisadas pela **aminotransferase** (transaminase) formam piruvato a partir da alanina, oxalacetato a partir do aspartato e α-cetoglutarato a partir do glutamato. Como essas reações são reversíveis, o ciclo também serve como uma fonte de esqueletos de carbono para a síntese desses aminoácidos. Outros aminoácidos contribuem para a gliconeogênese, visto que seus esqueletos de carbono dão origem a intermediários do ciclo do ácido cítrico. A alanina, cisteína, glicina, hidroxiprolina, serina, treonina e triptofano dão origem ao piruvato. A arginina, histidina, glutamina e prolina levam à produção de α-cetoglutarato; a isoleucina, metionina e valina dão origem à succinil-CoA; e a tirosina e fenilalanina produzem fumarato (ver Figura 17-4).

O ciclo do ácido cítrico em si não fornece uma via para a oxidação completa dos esqueletos de carbono de aminoácidos que dão origem a intermediários, como α-cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato e oxalacetato, pois isso resulta em aumento na quantidade de oxalacetato. Para que ocorra oxidação completa, o oxalacetato precisa sofrer fosforilação e carboxilação a fosfoenolpiruvato (à custa de GTP), em seguida desfosforilação a piruvato (em uma reação catalisada pela piruvato-quinase) e descarboxilação oxidativa a acetil-CoA (catalisada pela piruvato-desidrogenase).

Nos ruminantes, cujo principal combustível metabólico é constituído pelos ácidos graxos de cadeia curta formados pela fermentação bacteriana, a conversão do propionato, o principal produto glicogênico da fermentação no rúmen, em succinil-CoA pela via da metilmalonil-CoA (Figura 20-2) é particularmente importante.

O ciclo do ácido cítrico participa na síntese de ácidos graxos

A acetil-CoA, formada a partir do piruvato pela ação da piruvato-desidrogenase, constitui o principal substrato para a síntese de ácidos graxos de cadeia longa em animais não ruminantes (**Figura 17-5**). (Nos ruminantes, a acetil-CoA origina-se diretamente do acetato.) A piruvato-desidrogenase é uma enzima mitocon-

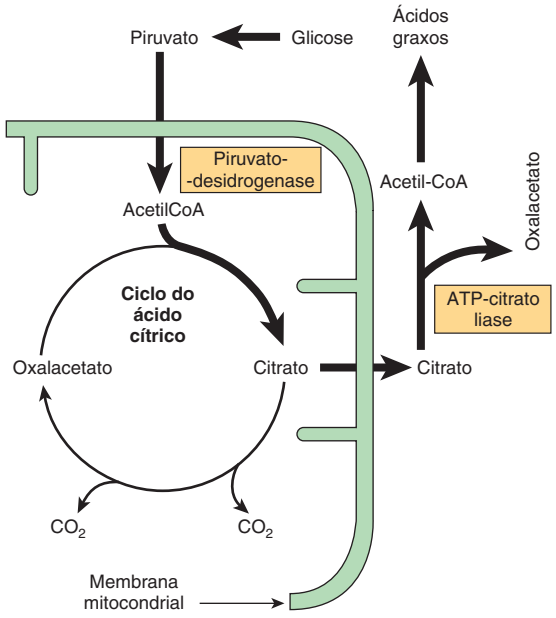


FIGURA 17-5 Participação do ciclo do ácido cítrico na síntese de ácidos graxos a partir da glicose. Ver também Figura 23-5.

drial, e a síntese de ácidos graxos é uma via citosólica; a membrana mitocondrial é impermeável à acetil-CoA. A acetil-CoA torna-se disponível no citosol a partir do citrato sintetizado nas mitocôndrias, transportado no citosol e clivado em uma reação catalisada pela **ATP-citrato liase** (Figura 17-5). O citrato só se torna disponível para ser transportado para fora das mitocôndrias quando a aconitase é inibida pelo seu produto e, portanto, está saturada com o seu substrato, de modo que o citrato não pode ser canalizado diretamente da citrato-sintase para a aconitase. Isso assegura que o citrato seja apenas utilizado para síntese de ácidos graxos quando houver uma quantidade adequada para suprir a atividade contínua do ciclo.

A regulação do ciclo do ácido cítrico depende principalmente de um suprimento de cofatores oxidados

Na maioria dos tecidos, onde o principal papel do ciclo do ácido cítrico consiste no metabolismo produtor de energia, a atividade do ciclo é regulada pelo **controle respiratório**, via cadeia respiratória e fosforilação oxidativa (Capítulo 13). Portanto, a atividade do ciclo depende imediatamente do suprimento de NAD^+ que, por sua vez, devido ao estreito acoplamento entre a oxidação e a fosforilação, depende da disponibilidade de ADP e, por isso, da taxa de utilização do ATP no trabalho químico e físico. Além disso, as enzimas do ciclo são reguladas individualmente. Os locais mais prováveis de regulação são as reações não equilibradas catalisadas pela piruvato-desidrogenase, citrato-sintase, isocitrato-desidrogenase e α-cetoglutarato-desidrogenase. As desidrogenases são ativadas pelo Ca^{2+}, cuja concentração aumenta durante a contração muscular e a secreção por outros tecidos, quando existe uma maior demanda de energia. Em um tecido como o cérebro, que depende altamente dos carboidratos para o suprimento de acetil-CoA, o controle do ciclo do ácido cítrico pode ocorrer na piruvato-desidrogenase. Várias enzimas respondem ao estado de energia, conforme demonstrado pelas razões [ATP]/[ADP] e [NADH]/[NAD^+]. Por conseguinte, ocorre inibição alostérica da citrato-sintase pelo ATP e acil-CoA de ácidos graxos de cadeia longa. A ativação alostérica da isocitrato-desidrogenase mitocondrial dependente de NAD pelo ADP é contrabalançada pelo ATP e NADH. O complexo da α-cetoglutarato-desidrogenase é regulada da mesma maneira que o complexo da piruvato-desidrogenase (Figura 18-6). A succinato-desidrogenase é inibida pelo oxalacetato, e a disponibilidade de oxalacetato, controlada pela malato-desidrogenase, depende da razão [NADH]/[NAD^+]. Como o valor de K_m da citrato-sintase para o oxalacetato é da mesma ordem de magnitude que a concentração intramitocondrial, é provável que a concentração de oxalacetato controle a velocidade de formação do citrato. Ainda não foram definidos quais desses mecanismos são importantes *in vivo*.

A hiperamonemia, que ocorre na doença hepática avançada e em algumas das doenças genéticas (raras) do metabolismo de aminoácidos, provoca perda da consciência, coma e convulsões, podendo ser fatal. Essa é a razão da retirada de α-cetoglutarato para formar glutamato (em uma reação catalisada pela glutamato desidrogenase) e, em seguida, glutamina (em uma reação catalisada pela glutamina-sintetase), levando a uma redução das concentrações de todos os intermediários do ciclo do ácido cítrico e, portanto, a uma produção reduzida de ATP. O equilíbrio da glutamato-desidrogenase é primorosamente mantido, e o sentido da reação depende da razão NAD^+: NADH e da concentração de íons amônio. Além disso, a amônia inibe a α-cetoglutarato-desidrogenase e, possivelmente também, a piruvato-desidrogenase.

RESUMO

- O ciclo do ácido cítrico constitui a via final para a oxidação dos carboidratos, dos lipídeos e das proteínas. O metabólito final comum, a acetil-CoA, reage com oxalacetato para formar citrato. Por uma série de desidrogenações e descarboxilações, o citrato é degradado, com redução das coenzimas, liberação de 2 CO_2 e regeneração do oxalacetato.
- As coenzimas reduzidas são oxidadas pela cadeia respiratória ligada à formação de ATP. Assim, o ciclo constitui a principal via de formação de ATP e localiza-se na matriz mitocondrial, adjacente às enzimas da cadeia respiratória e da fosforilação oxidativa.
- O ciclo do ácido cítrico é anfibólico, visto que, além da oxidação, é importante no fornecimento de esqueletos de carbono para a gliconeogênese, para a síntese de ácidos graxos e para a interconversão de aminoácidos.

REFERÊNCIAS

Baldwin JE, Krebs HA: The evolution of metabolic cycles. Nature 1981;291:381.

Bowtell JL, Bruce M: Glutamine: an anaplerotic precursor. Nutrition 2002;18:222.

Briere JJ, Favier J, Giminez-Roqueplo A-P, et al: Tricarboxylic acid cycle dysfunction as a cause of human diseases and tumor formation. Am J Physiol Cell Physiol 2006;291:C1114.

Brunengraber H, Roe CR: Anaplerotic molecules: current and future. J Inherit Metab Dis 2006;29:327.

De Meirleir L: Defects of pyruvate metabolism and the Krebs cycle. J Child Neurol 2002;Suppl 3:3S26.

Gibala MJ, Young ME: Anaplerosis of the citric acid cycle: role in energy metabolism of heart and skeletal muscle. Acta Physiol Scand 2000;168:657.

Hertz L, Kala G: Energy metabolism in brain cells: effects of elevated ammonia concentrations. Metab Brain Dis 2007; 22: 199–218.

Jitrapakdee S, Vidal-Puig A, Wallace JC: Anaplerotic roles of pyruvate carboxylase in mammalian tissues. Cell Mol Life Sci 2006; 63:843.

Jitrapakdee S, St Maurice M, Rayment I, et al: Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. Biochem J 2008;413:369

Kay J, Weitzman PDJ (editors): Krebs' Citric Acid Cycle—Half a Century and Still Turning. Biochemical Society, 1987.

Kornberg H: Krebs and his trinity of cycles. Nat Rev Mol Cell Biol 2000;1:225.

Ott P, Clemmesen O, Larsen FS: Cerebral metabolic disturbances in the brain during acute liver failure: from hyperammonemia to energy failure and proteolysis. Neurochem Int 2005;47:13.

Owen OE, Kalhan SC: The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. J Biol Chem 2002;277:30409.

Pithukpakorn, M: Disorders of pyruvate metabolism and the tricarboxylic acid cycle. Mol Genet Metab 2005;85:243.

Sumegi B, Sherry AD: Is there tight channelling in the tricarboxylic acid cycle metabolon? Biochem Soc Trans 1991;19:1002.

Glicólise e Oxidação do Piruvato

18

David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever a via da glicólise e seu controle e explicar como esta pode atuar em condições anaeróbias.
- Referir a reação da piruvato-desidrogenase e sua regulação.
- Explicar como a inibição do metabolismo do piruvato leva à acidose láctica.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A maior parte dos tecidos tem pelo menos alguma necessidade de glicose. No cérebro, essa necessidade é considerável, e até mesmo no jejum prolongado, o cérebro não pode obter mais do que cerca de 20% de sua necessidade energética a partir dos corpos cetônicos. A glicólise, que é a principal via do metabolismo da glicose, ocorre no citosol de todas as células. A glicólise é singular, visto que pode ocorrer em condições tanto aeróbias quanto anaeróbias, dependendo da disponibilidade de oxigênio e da cadeia de transporte de elétrons. Os eritrócitos, que carecem de mitocôndrias, dependem totalmente da glicose como combustível metabólico e a metabolizam por glicólise anaeróbia. Entretanto, para oxidar a glicose além do piruvato (o produto final da glicólise), é necessária a presença de oxigênio e de sistemas enzimáticos mitocondriais, como o complexo da piruvato-desidrogenase, o ciclo do ácido cítrico (Capítulo 17) e a cadeia respiratória (Capítulo 13).

A glicólise constitui a principal via de metabolismo da glicose e também representa a principal via para o metabolismo da frutose, galactose e outros carboidratos de origem alimentar. A capacidade da glicólise de produzir ATP na ausência de oxigênio é particularmente importante, já que o músculo esquelético pode ter um desempenho em altos níveis de trabalho, quando o suprimento de oxigênio é insuficiente, e também porque permite aos tecidos sobreviver durante episódios de anoxia. Todavia, o músculo cardíaco, que está adaptado ao trabalho aeróbio, apresenta uma atividade glicolítica relativamente baixa e uma sobrevida precária em condições de **isquemia**. As doenças em que ocorre deficiência de enzimas da glicólise (p. ex., piruvato-quinase) manifestam-se principalmente como **anemias hemolíticas** ou, quando o defeito afeta o músculo esquelético (p. ex., fosfofrutoquinase), como **fadiga**. Nas células cancerosas em rápido crescimento, a glicólise ocorre em alta velocidade, formando grandes quantidades de piruvato, que é reduzido a lactato e exportado. Isso produz um ambiente local relativamente ácido no tumor, que pode ter implicações no tratamento do câncer. O lactato é usado para a gliconeogênese no fígado (Capítulo 20), um processo que consome energia e que é responsável por grande parte do **hipermetabolismo** observado na **caquexia do câncer**. A **acidose láctica** tem várias causas, incluindo comprometimento da atividade da piruvato-desidrogenase, particularmente na deficiência de tiamina (vitamina B_1).

A GLICÓLISE PODE FUNCIONAR EM CONDIÇÕES ANAERÓBIAS

No início das pesquisas sobre a glicólise, foi constatado que a fermentação que ocorria nas leveduras era semelhante à degradação do glicogênio nos músculos. Foi observado que, quando um músculo se contrai em um meio anaeróbio, isto é, um ambiente em que o oxigênio foi excluído, o **glicogênio desaparece**, enquanto **aparece o lactato**. Quando o oxigênio é reintroduzido, ocorre recuperação aeróbia, e o lactato deixa de ser produzido. Todavia, se a contração ocorre em condições aeróbias, o lactato não se acumula, e o piruvato constitui o principal produto final da glicólise. O piruvato é oxidado subsequentemente a CO_2 e água (**Figura 18-1**). Quando o suprimento de oxigênio torna-se escasso, a reoxidação mitocondrial do NADH formado durante a glicólise é comprometida, e o NADH é reoxidado pela redução do piruvato a lactato, permitindo, assim, que a glicólise prossiga (Figura 18-1). Embora a glicólise possa ocorrer em condições anaeróbias, isso tem um preço, pois o processo limita a quanti-

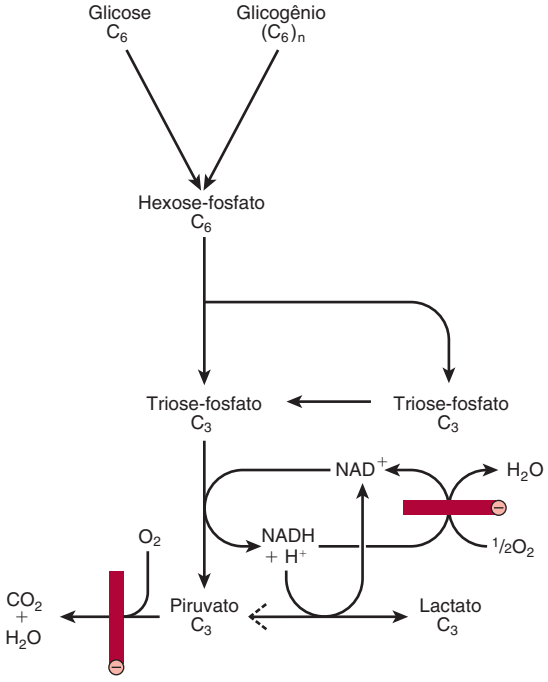


FIGURA 18-1 Resumo da glicólise. ⊖, bloqueio por condições anaeróbias ou pela ausência de mitocôndrias contendo enzimas respiratórias essenciais, conforme observado nos eritrócitos.

dade de ATP formada por mol de glicose oxidada, de modo que uma quantidade muito maior de glicose precisa ser metabolizada em condições anaeróbias em vez de em condições aeróbias. Nas leveduras e em alguns outros microrganismos, o piruvato formado na glicólise anaeróbia não é reduzido a lactato, porém descarboxilado e reduzido a etanol.

AS REAÇÕES DA GLICÓLISE CONSTITUEM A PRINCIPAL VIA DE UTILIZAÇÃO DA GLICOSE

A equação global para a glicólise, desde a glicose até o lactato, é a seguinte:

$$\text{Glicose} + 2\ \text{ADP} + 2\ P_i \rightarrow 2\ \text{Lactato} + 2\ \text{ATP} + 2\ H_2O$$

Todas as enzimas da glicólise (**Figura 18-2**) são encontradas no citosol. A glicose entra na glicólise por fosforilação a glicose-6-fosfato, em uma reação catalisada pela **hexoquinase**, utilizando ATP como doador de fosfato. Em condições fisiológicas, a fosforilação da glicose a glicose-6-fosfato pode ser considerada irreversível. A hexoquinase sofre inibição alostérica pelo seu produto, a glicose-6-fosfato.

Em outros tecidos além do fígado (e das células β das ilhotas do pâncreas), a disponibilidade de glicose para a glicólise (ou para a síntese de glicogênio no músculo, Capítulo 19, e para a lipogênese no tecido adiposo, Capítulo 23) é controlada pelo seu transporte na célula, o qual, por sua vez, é regulado pela **insulina**. A hexoquinase tem alta afinidade (baixo valor de K_m) para a glicose e, no fígado, é saturada em condições normais, de modo que atua em uma velocidade constante para fornecer glicose-6-fosfato para atender às necessidades do fígado. As células hepáticas também contêm uma isoenzima da hexoquinase, a **glicoquinase**, cujo valor de K_m é muito mais alto do que a concentração intracelular normal de glicose. A função da glicoquinase no fígado consiste em remover a glicose do sangue depois de uma refeição, fornecendo glicose-6-fosfato em quantidades acima das necessárias para a glicólise, que é usada para a síntese de glicogênio e para a lipogênese. A glicoquinase também é encontrada nas células β das ilhotas do pâncreas, onde atua para detectar altas concentrações de glicose; os metabólitos da glicose-6-fosfato formados estimulam a secreção de insulina.

A glicose-6-fosfato é um composto importante situado na junção de diversas vias metabólicas: a glicólise, a gliconeogênese, a via de pentose-fosfato, a glicogênese e a glicogenólise. Na glicólise, é convertida em frutose-6-fosfato pela **fosfoexose isomerase**, que envolve uma isomerização aldose-cetose. Essa reação é seguida de outra fosforilação, catalisada pela enzima **fosfofrutoquinase** (fosfofrutoquinase-1), formando frutose 1,6-bifosfato. A reação da fosfofrutoquinase pode ser considerada funcionalmente irreversível em condições fisiológicas; é induzível e sujeita à regulação alostérica e desempenha um importante papel na regulação da velocidade da glicólise. A frutose-1,6-bifosfato é clivada pela **aldolase** (frutose-1,6-bifosfato aldolase) em duas triose-fosfatos, o gliceraldeído-3-fosfato e a di-hidroxiacetona-fosfato, que são interconvertidos pela enzima **fosfotriose-isomerase**.

A glicólise prossegue com a oxidação do gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato. A enzima que catalisa essa oxidação, a **gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase**, é dependente de NAD. Do ponto de vista estrutural, a enzima consiste em quatro polipeptídeos idênticos (monômeros), formando um tetrâmero. Existem quatro grupos –SH em cada polipeptídeo, que derivam de resíduos de cisteína presentes na cadeia polipeptídica. Um dos grupos –SH é encontrado no sítio ativo da enzima (**Figura 18-3**). Inicialmente, o substrato combina-se com esse grupo –SH, formando um tio-hemiacetal, que é oxidado em um éster tiol; os hidrogênios removidos nessa oxidação são transferidos para o NAD^+. Em seguida, o éster tiol sofre fosforólise; o fosfato inorgânico (P_i) é acrescentado, formando 1,3-bifosfoglicerato, e o grupo –SH é reconstituído.

Na reação seguinte, catalisada pela **fosfoglicerato-quinase**, o fosfato é transferido do 1,3-bifosfoglicerato para o ADP, formando ATP (fosforilação em nível de substrato) e 3-fosfoglicerato. Como duas moléculas de triose fosfato são formadas para cada molécula de glicose que sofre glicólise, são produzidas duas moléculas de ATP nessa reação por molécula de glicose na via da glicólise. A toxicidade do arsênico decorre da competição do arsenato com o fosfato inorgânico (P_i) nessa reação, produzindo 1-arseno-3-fosfoglicerato, que sofre hidrólise espontânea a 3-fosfoglicerato, sem formar ATP. O 3-fosfoglicerato é isomerizado a 2-fosfoglicerato pela **fosfoglicerato-mutase**. É provável que o 2,3-bifosfoglicerato (bifosfoglicerato, BPG) seja um intermediário nessa reação.

A etapa subsequente é catalisada pela **enolase** e envolve uma desidratação, formando fosfoenolpiruvato. A enolase é inibida pelo **fluoreto**, e quando são coletadas amostras de sangue para

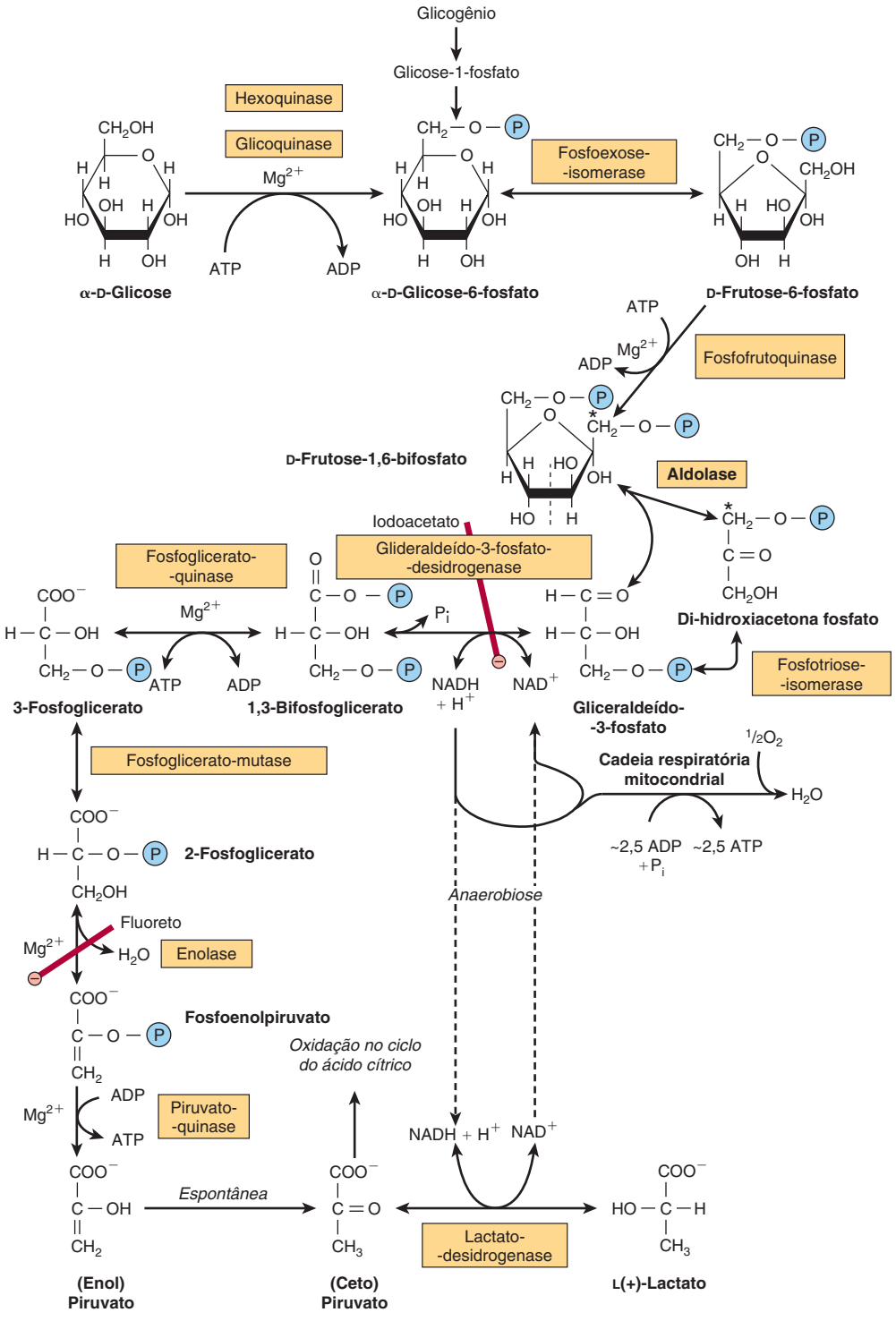


FIGURA 18-2 A via da glicólise. (Ⓟ, $-PO_3^{2-}$; P_i, $HOPO_3^{2-}$; ⊖, inibição.) *Os carbonos 1 a 3 da frutose-bifosfato formam di-hidroxiacetona-fosfato, enquanto os carbonos 4 a 6 formam gliceraldeído-3-fosfato. O prefixo "bi", como no bifosfato, indica que grupos fosfato estão separados, enquanto prefixo "di", como em adenosina difosfato, indica que eles estão juntos.

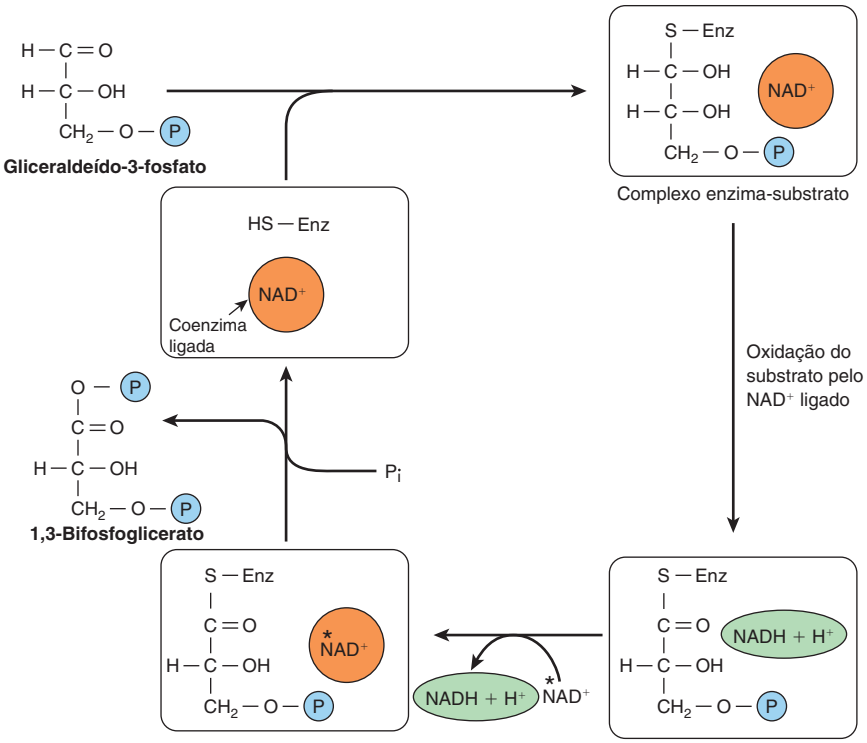


FIGURA 18-3 Mecanismo de oxidação do gliceraldeído-3-fosfato. (Enz, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.) A enzima é inibida pelo iodoacetato, um veneno para –SH, que, por esse motivo, tem a capacidade de inibir a glicólise. O NADH produzido sobre a enzima não está firmemente ligado a ela, como o NAD^+. Consequentemente, o NADH é facilmente deslocado por outra molécula de NAD^+.

medir a glicose, empregam-se tubos contendo fluoreto para inibir a glicólise. A enzima também depende da presença de Mg^{2+} ou Mn^{2+}. O fosfato do fosfoenolpiruvato é transferido para o ADP pela **piruvato-quinase**, formando duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose oxidada. A reação da piruvato-quinase é essencialmente irreversível em condições fisiológicas, em parte devido à grande mudança de energia livre envolvida e, em parte, devido ao produto imediato da reação catalisada pela enzima, o enolpiruvato, que sofre isomerização espontânea a piruvato, de modo que o produto da reação não está disponível para sofrer a reação inversa.

O estado redox do tecido determina, neste momento, qual das duas vias será seguida. Em condições **anaeróbias**, o NADH não pode ser reoxidado a oxigênio pela cadeia respiratória. O piruvato é reduzido pelo NADH a lactato, em uma reação catalisada pela **lactato-desidrogenase**. Existem diferentes isoenzimas teciduais específicas da lactato-desidrogenase que possuem relevância clínica (Capítulo 7). A reoxidação do NADH por meio da formação de lactato permite que a glicólise prossiga na ausência de oxigênio, regenerando NAD^+ em quantidade suficiente para outro ciclo da reação catalisada pela gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase. Em **condições aeróbias**, o piruvato é captado nas mitocôndrias e, após descarboxilação oxidativa a acetil-CoA, é oxidado a CO_2 pelo ciclo do ácido cítrico (Capítulo 17). Os equivalentes redutores derivados do NADH formado durante a glicólise são captados pelas mitocôndrias para oxidação por meio de um dos dois transportes descritos no Capítulo 13.

Os tecidos que funcionam em condições hipóxicas produzem lactato

Isso é verdadeiro para o músculo esquelético, particularmente para as fibras brancas, onde a intensidade de trabalho e, portanto, a necessidade de formação de ATP, pode ultrapassar a velocidade de captação e utilização do oxigênio. A glicólise nos eritrócitos sempre termina em lactato, pois as reações subsequentes de oxidação do piruvato são mitocondriais, e os eritrócitos carecem de mitocôndrias. Outros tecidos que normalmente obtêm grande parte de sua energia a partir da glicólise e que produzem lactato incluem o cérebro, o trato gastrintestinal, a medula renal, a retina e a pele. A produção de lactato também aumenta em caso de choque séptico, e muitos tipos de câncer também produzem lactato. O fígado, os rins e o coração geralmente captam o lactato e o oxidam, porém o produzem em condições hipóxicas.

Quando a produção de lactato está elevada, como no exercício físico vigoroso, em caso de choque séptico e na caquexia do câncer, grande parte é usada pelo fígado para a gliconeogênese (Capítulo 20), resultando em aumento da taxa metabólica para produzir o ATP e o GTP necessários. O aumento do consumo de oxigênio em consequência da oxidação aumentada de combustíveis metabólicos para fornecer o ATP e o GTP essenciais para a gliconeogênese é considerado como **débito de oxigênio** após exercício físico vigoroso.

Em algumas condições, pode haver formação de lactato no citosol; todavia, esse lactato entra então nas mitocôndrias para ser oxidado a piruvato e prosseguir o seu metabolismo. Isso for-

nece uma via para a transferência de equivalentes redutores do citosol para as mitocôndrias na cadeia de transporte de elétrons, além do transporte do glicerofosfato (Figura 13-12) e do malato (Figura 13-13).

A GLICÓLISE É REGULADA EM TRÊS ETAPAS QUE ENVOLVEM REAÇÕES QUE NÃO ESTÃO EM EQUILÍBRIO

Embora a maior parte das reações da glicólise seja reversível, três delas são acentuadamente exergônicas e, portanto, devem ser consideradas fisiologicamente irreversíveis. Essas reações, que são catalisadas pela **hexoquinase** (e glicoquinase), **fosfofrutoquinase** e **piruvato-quinase**, constituem os principais locais de regulação da glicólise. A fosfofrutoquinase é significativamente inibida por concentrações intracelulares normais de ATP. Conforme discutido no Capítulo 20, essa inibição pode ser rapidamente aliviada pelo 5′ AMP que se forma à medida que o ADP começa a se acumular, sinalizando a necessidade de aumentar a velocidade da glicólise. As células com capacidade de **gliconeogênese** (que reverte a via glicolítica, Capítulo 20) possuem diferentes enzimas que catalisam reações para reverter essas etapas irreversíveis: a glicose-6-fosfatase, a frutose-1,6-bifosfatase e, para reverter a reação da piruvato-quinase, a piruvato-carboxilase e a fosfoenolpiruvato carboxiquinase. A **frutose** entra na glicólise por fosforilação a frutose-1-fosfato e transpõe as principais etapas reguladoras, resultando, assim, na formação de mais piruvato (e acetil-CoA) do que o necessário para a formação de ATP (Capítulo 21). No fígado e no tecido adiposo, isso leva a um aumento da lipogênese, de modo que um grande consumo de frutose pode representar um fator no desenvolvimento da obesidade.

Nos eritrócitos, o primeiro local de formação de ATP na glicólise pode ser contornado

Nos eritrócitos, a reação catalisada pela **fosfoglicerato-quinase** pode ser, até certo ponto, contornada pela reação da **bifosfoglicerato-mutase**, que catalisa a conversão do 1,3-bifosfoglicerato em 2,3-bifosfoglicerato, seguida de hidrólise a 3-fosfoglicerato e P_i, em uma reação catalisada pela **2,3-bifosfoglicerato-fosfatase** (**Figura 18-4**). Essa via alternativa não envolve nenhuma produção efetiva de ATP a partir da glicólise. Entretanto, serve para produzir 2,3-bifosfoglicerato, que se liga à hemoglobina, diminuindo a sua afinidade pelo oxigênio e, assim, tornando-o mais prontamente disponível para os tecidos (ver Capítulo 6).

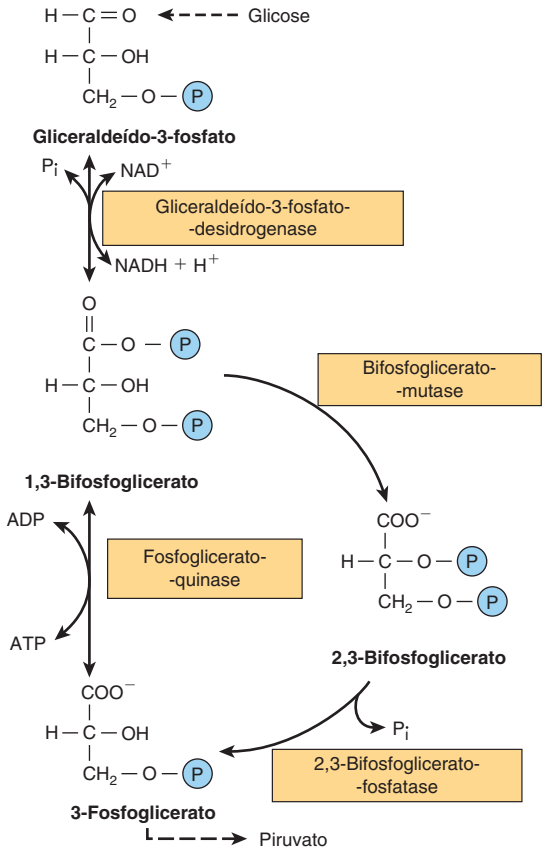


FIGURA 18-4 Via do 2,3-bifosfoglicerato nos eritrócitos.

A OXIDAÇÃO DO PIRUVATO A ACETIL-COA CONSTITUI A VIA IRREVERSÍVEL DA GLICÓLISE PARA O CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO

O piruvato, que é formado no citosol, é transportado para o interior das mitocôndrias por transportador simporte de prótons (Figura 13-10). No interior das mitocôndrias, o piruvato sofre descarboxilação oxidativa em acetil-CoA por um complexo multienzimático que está associado à membrana mitocondrial interna. Esse **complexo de piruvato-desidrogenase** é análogo ao complexo da α-cetoglutarato-desidrogenase do ciclo do ácido cítrico (Figura 17-3). O piruvato é descarboxilado pelo componente **piruvato-desidrogenase** do complexo enzimático, formando um derivado hidroxietil do anel tiazólico da timina pirofosfato ligada à enzima que, por sua vez, reage com a lipoamida oxidada, o grupo prostético da **di-hidrolipoil-transacetilase**, formando acetil lipoamida (**Figura 18-5**). A tiamina é a vitamina B_1 (Capítulo 44), e a sua deficiência compromete o metabolismo da glicose, e ocorrem acidose láctica e acidose pirúvica significativas (e potencialmente fatais). A acetil-lipoamida reage com a coenzima A para formar acetil-CoA e lipoamida reduzida. A reação é finalizada quando a lipoamida reduzida é reoxidada por uma flavoproteína, a **di-hidrolipoil-desidrogenase**, que contém FAD. Por fim, a flavoproteína reduzida é oxidada pelo NAD^+ que, por sua vez, transfere equivalentes redutores à cadeia respiratória. A reação global é:

$$\text{Piruvato} + NAD^+ + \text{CoA} \rightarrow \text{Acetil-CoA} + NADH + H^+ + CO_2$$

O complexo da piruvato-desidrogenase consiste em diversas cadeias polipeptídicas de cada uma das três enzimas componentes, e os intermediários não se dissociam, porém permanecem ligados às enzimas. Esse complexo enzimático, em que os substratos são canalizados de uma enzima para a próxima, aumenta a velocidade da reação e impede reações colaterais, aumentando a sua eficiência global.

A piruvato-desidrogenase é regulada por inibição por meio dos produtos finais e por modificação covalente

A piruvato-desidrogenase é inibida pelos seus produtos, a acetil-CoA e o NADH (**Figura 18-6**). É também regulada pela fosforilação (catalisada por uma quinase) de três resíduos de serina no componente piruvato-desidrogenase do complexo multienzimático, resultando em diminuição da atividade, e por desfosforilação (catalisada por uma fosfatase) que provoca aumento da atividade. A quinase é ativada por aumentos das razões [ATP]/[ADP], [acetil-CoA]/[CoA] e [NADH]/[NAD^+]. Assim, a piruvato-desidrogenase e, portanto, a glicólise são inibidas quando existe uma quantidade adequada disponível de ATP (e coenzimas reduzidas para a formação de ATP) e quando ocorre oxidação de ácidos graxos. No jejum, quando aumentam as concentrações de ácidos graxos livres, verifica-se uma diminuição na proporção da enzima na sua forma ativa, resultando em preservação de carboidratos. No tecido adiposo, onde a glicose fornece acetil-CoA para a lipogênese, a enzima é ativada em resposta à insulina.

A oxidação da glicose produz até 32 mols de ATP em condições aeróbias, porém apenas dois mols na ausência de O_2

Quando 1 mol de glicose sofre combustão em um calorímetro a CO_2 e água, aproximadamente 2.870 kJ são liberados na forma de calor. Quando a oxidação ocorre nos tecidos, aproximadamente 32 mols de ATP são gerados por molécula de glicose oxidada a CO_2 e água. *In vivo*, o valor de ΔG para a reação de ATP-sintase foi calculado em aproximadamente 51,6 kJ. Por conseguinte, a energia total captada na forma de ATP por mol de glicose oxidada é de 1.651 kJ, ou aproximadamente 58% da energia de combustão. A maior parte do ATP forma-se por fosforilação oxidativa em decorrência da reo-

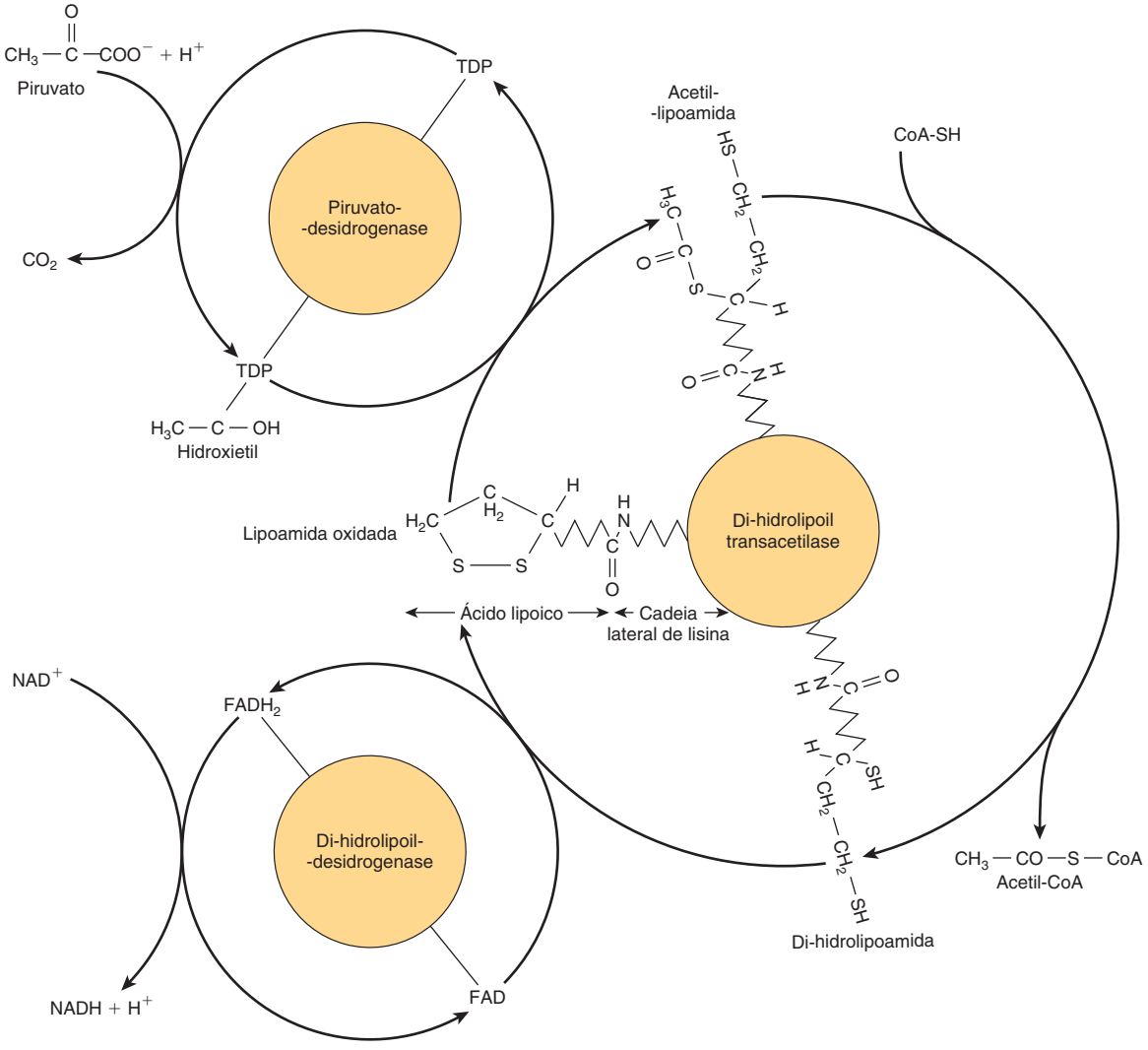


FIGURA 18-5 Descarboxilação oxidativa do piruvato pelo complexo da piruvato-desidrogenase. O ácido lipoico une-se por uma ligação amida a um resíduo de lisina do componente transacetilase do complexo enzimático. Forma um longo braço flexível, possibilitando a rotação sequencial do grupo prostético do ácido lipoico entre os sítios ativos de cada uma das enzimas do complexo. (FAD, flavina adenina dinucleotídeo; NAD^+, nicotinamida adenina dinucleotídeo; TDP, tiamina-pirofosfato.)

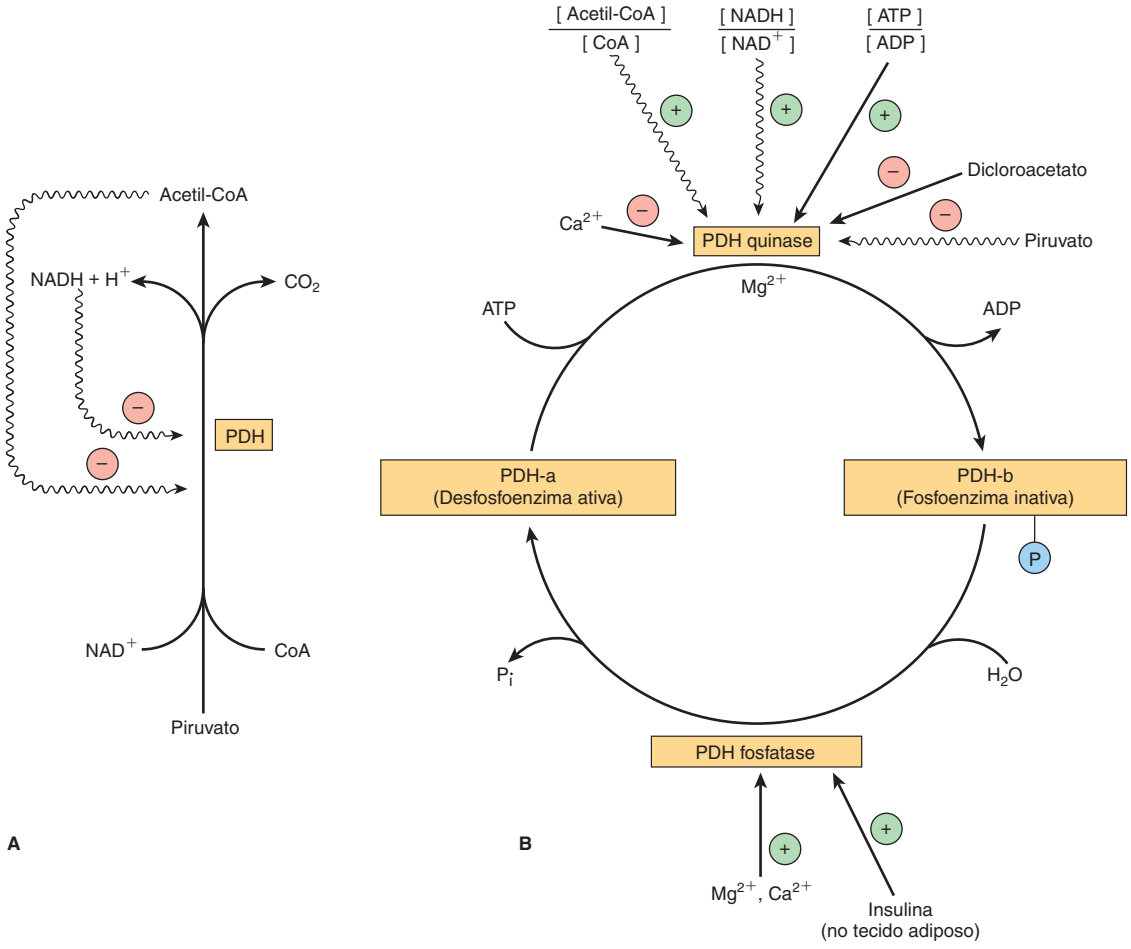


FIGURA 18-6 Regulação da piruvato-desidrogenase (PDH). As setas onduladas indicam efeitos alostéricos. **(A)** Regulação por inibição pelos produtos finais. **(B)** Regulação por interconversão entre as formas ativa e inativa.

xidação de coenzimas reduzidas na cadeia respiratória. O restante é formado pela fosforilação em nível de substrato (**Tabela 18-1**).

ASPECTOS CLÍNICOS

A inibição do metabolismo do piruvato leva à acidose láctica

Os íons arsenito e mercúrio reagem com os grupos –SH do ácido lipoico e inibem a piruvato-desidrogenase, do mesmo modo que a **deficiência alimentar de tiamina** (Capítulo 44) possibilita o acúmulo de piruvato. Muitos alcoólicos apresentam deficiência de tiamina (devido a uma alimentação precária e também devido à inibição da absorção de tiamina pelo álcool) e podem desenvolver acidose pirúvica e acidose láctica potencialmente fatais. Os pacientes com **deficiência hereditária de piruvato-desidrogenase**, que pode resultar de defeitos em um ou mais dos componentes do complexo enzimático, também apresentam acidose láctica, particularmente após uma carga de glicose. Devido à dependência cerebral da glicose como fonte de energia, esses defeitos metabólicos frequentemente causam distúrbios neurológicos.

A deficiência hereditária de aldolase A e a deficiência de piruvato-quinase nos eritrócitos causam **anemia hemolítica**. Os pacientes com **deficiência de fosfofrutoquinase muscular** têm baixa capacidade de efetuar exercícios físicos, particularmente quando consomem uma alimentação rica em carboidratos. A capacidade de trabalho progride quando são fornecidos lipídeos como fonte de energia alternativa, como, por exemplo, durante o jejum prolongado, quando os ácidos graxos livres e os corpos cetônicos no sangue estão aumentados.

RESUMO

- A glicólise é a via citosólica de todas as células de mamíferos para o metabolismo da glicose (ou do glicogênio) a piruvato e lactato.
- A glicólise pode funcionar de modo anaeróbio, regenerando o NAD^+ oxidado (necessário na reação da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase) pela redução do piruvato a lactato.
- O lactato é o produto final da glicólise em condições anaeróbias (p. ex., no músculo em exercício) ou, nos eritrócitos, que carecem de mitocôndrias para a oxidação subsequente do piruvato.

TABELA 18-1 Formação de ATP no catabolismo da glicose

Via	Reação catalisada por	Método de formação de ATP	ATP por mol de glicose
Glicólise	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase	Oxidação de 2 NADH na cadeia respiratória	5[1]
	Fosfoglicerato-quinase	Fosforilação em nível do substrato	2
	Piruvato-quinase	Fosforilação em nível do substrato	2
			9
	Consumo de ATP para as reações da hexoquinase e da fosfofrutoquinase		−2
			Total efetivo 7
Ciclo do ácido cítrico	Piruvato-desidrogenase	Oxidação de 2 NADH na cadeia respiratória	5
	Isocitrato-desidrogenase	Oxidação de 2 NADH na cadeia respiratória	5
	α-cetoglutarato-desidrogenase	Oxidação de 2 NADH na cadeia respiratória	5
	Succinato-tioquinase	Fosforilação em nível de substrato	2
	Succinato-desidrogenase	Oxidação de 2 $FADH_2$ na cadeia respiratória	3
	Malato-desidrogenase	Oxidação de 2 NADH na cadeia respiratória	5
			Total efetivo 25
	Total por mol de glicose em condições aeróbias		32
	Total por mol de glicose em condições anaeróbias		2

[1] Isso pressupõe que o NADH formado durante a glicólise é transportado nas mitocôndrias pelo transporte de malato (Figura 13-13). Se for usado o transporte de glicerofosfato, haverá formação de apenas 1,5 ATP por mol de NADH. Observe que existe uma considerável vantagem em empregar o glicogênio em lugar da glicose para a glicólise anaeróbia no músculo, visto que o produto da glicogênio fosforilase é a glicose-1-fosfato (Figura 19-1), passível de interconversão com a glicose-6-fosfato. Isso poupa o ATP que, de outro modo, seria utilizado pela hexoquinase, aumentando o rendimento efetivo de ATP de 2 para 3 por molécula de glicose.

- A glicólise é regulada por três enzimas que catalisam reações que não estão em equilíbrio: a hexoquinase, a fosfofrutoquinase e a piruvato-quinase.
- Nos eritrócitos, o primeiro local de glicólise para a produção de ATP pode ser contornado, levando à formação de 2,3-bifosfoglicerato, que é importante na diminuição da afinidade da hemoglobina pelo O_2.
- O piruvato é oxidado a acetil-CoA por um complexo multienzimático, a piruvato-desidrogenase, que depende de um cofator derivado de vitamina, a tiamina pirofosfato.
- As condições que comprometem o metabolismo do piruvato frequentemente levam à acidose láctica.

REFERÊNCIAS

Behal RH, Buxton DB, Robertson JG, Olson MS: Regulation of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. Annu Rev Nutr 1993;13:497.

Boiteux A, Hess B: Design of glycolysis. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1981;293:5.

Fothergill-Gilmore LA: The evolution of the glycolytic pathway. Trends Biochem Sci 1986;11:47.

Gladden LB: Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. J Physiol 2004;558:5.

Kim J-W, Dang CV: Multifaceted roles of glycolytic enzymes. Trends Biochem Sci 2005;30:142.

Levy B: Lactate and shock state: the metabolic view. Curr Opin Crit Care 2006;1:315.

Maj MC, Cameron JM, Robinson BH: Pyruvate dehydrogenase phosphatase deficiency: orphan disease or an under-diagnosed condition? Mol Cell Endocrinol 2006;249:1.

Martin E, Rosenthal RE, Fiskum G: Pyruvate dehydrogenase complex: metabolic link to ischemic brain injury and target of oxidative stress. J Neurosci Res 2005;79:240.

Patel MS, Korotchkina LG: Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. Biochem Soc Trans 2006;34:217.

Philp A, Macdonald AL, Watt PW: Lactate—a signal coordinating cell and systemic function. J Exp Biol 2005;208:4561.

Pumain R, Laschet J: A key glycolytic enzyme plays a dual role in GABAergic neurotransmission and in human epilepsy. Crit Rev Neurobiol 2006;18:197.

Rider MH, Bertrand L, Vertommen D, et al: 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. Biochem J 2004;381:561.

Robergs RA, Ghiasvand F, Parker D: Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. Am J Physiol 2004;287:R502.

Sugden MC, Holness MJ: Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases. Arch Physiol Biochem 2006;112:139.

Wasserman DH: Regulation of glucose fluxes during exercise in the postabsorptive state. Annu Rev Physiol 1995;57:191.

19 Metabolismo do Glicogênio

David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever a estrutura do glicogênio e a sua importância como reserva de carboidratos.
- Caracterizar a síntese e a degradação do glicogênio e o modo pelo qual os processos são regulados em resposta à ação hormonal.
- Referir os vários tipos de doenças de armazenamento de glicogênio.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

O glicogênio é o principal carboidrato de armazenamento nos animais, correspondendo ao amido nas plantas. Trata-se de um polímero ramificado de α-D-glicose (Figura 14-13). Ocorre principalmente no fígado e nos músculos, com presença de quantidades modestas no cérebro. Embora o teor de glicogênio no fígado seja maior que o do músculo, cerca de 75% do glicogênio corporal total encontram-se nos músculos, visto que a massa muscular do corpo é consideravelmente maior que a do fígado (**Tabela 19-1**).

O glicogênio muscular representa uma fonte prontamente disponível de glicose-1-fosfato para a glicólise no próprio músculo. O glicogênio hepático serve para armazenar e exportar a glicose para manter o nível de **glicemia** durante o jejum. A concentração hepática de glicogênio é de cerca de 450 mM após uma refeição, caindo para cerca de 200 mM depois de uma noite de jejum; após 12 a 18 h de jejum, o glicogênio do fígado está quase totalmente esgotado. Embora o glicogênio dos músculos não forneça diretamente glicose livre (pois o músculo carece de glicose-6-fosfatase), o piruvato formado pela glicólise no músculo pode sofrer transaminação em alanina, que é exportada pelo músculo e usada para a gliconeogênese no fígado (Figura 20-4). As **doenças de armazenamento do glicogênio** constituem um grupo de distúrbios hereditários que se caracterizam pela mobilização deficiente de glicogênio ou pelo depósito de formas anormais de glicogênio, levando à lesão hepática e fraqueza muscular; algumas doenças de armazenamento de glicogênio resultam em morte precoce.

A estrutura altamente ramificada do glicogênio (Figura 14-13) fornece um grande número de locais para a glicogenólise, possibilitando a rápida liberação de glicose-1-fosfato para a atividade muscular. Os atletas de resistência necessitam de uma liberação mais lenta e mais sustentada de glicose-1-fosfato. A formação de pontos de ramificação no glicogênio é mais lenta do que a adição de unidades de glicose a uma cadeia linear, e alguns atletas de resistência praticam a **carga de carboidratos** – isto é, exercício físico até a exaustão (quando o glicogênio muscular é, em grande parte, esgotado), seguido de refeição rica em carboidratos, resultando na rápida síntese de glicogênio com menos pontos de ramificação do que o normal.

TABELA 19-1 Armazenamento de carboidratos em um ser humano de 70 kg

	Porcentagem de peso tecidual	Peso tecidual	Conteúdo corporal (g)
Glicogênio hepático	5,0	1,8 kg	90
Glicogênio muscular	0,7	35 kg	245
Glicose extracelular	0,1	10 L	10

A GLICOGÊNESE OCORRE PRINCIPALMENTE NO MÚSCULO E NO FÍGADO

A via de biossíntese de glicogênio envolve um nucleotídeo especial de glicose

Como no caso da glicólise, a glicose é fosforilada a glicose-6-fosfato, em uma reação catalisada pela **hexoquinase** no músculo e pela **glicoquinase** no fígado (**Figura 19-1**). A glicose-6-fosfato é isomerizada a glicose-1-fosfato pela **fosfoglicomutase**. A própria enzima é fosforilada, e o grupo fosfato participa de uma reação reversível, em que a glicose-1,6-bifosfato é um intermediário. Em seguida, a glicose-1-fosfato reage com uridina trifosfato (UTP) para formar o nucleotídeo ativo, a **uridina-difosfato-glicose** (**UDPGlc**), e pirofosfato (**Figura 19-2**), em uma reação catalisada pela **UDPGlc pirofosforilase**. A reação ocorre na direção da formação de UDPGlc, pois a **pirofosfatase** catalisa a hidrólise do pirofosfato a 2 × fosfato, removendo, assim, um dos produtos da reação. A UPDGlc pirofosforilase apresenta um baixo valor de K_m para a glicose-1-fosfato e está presente em quantidades relativamente grandes, de modo que não constitui uma etapa reguladora na síntese de glicogênio.

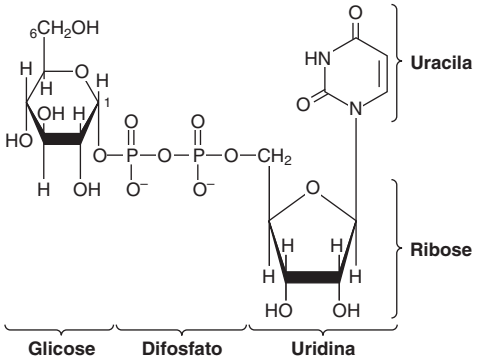


FIGURA 19-2 Uridina difosfato glicose (UDPGlc).

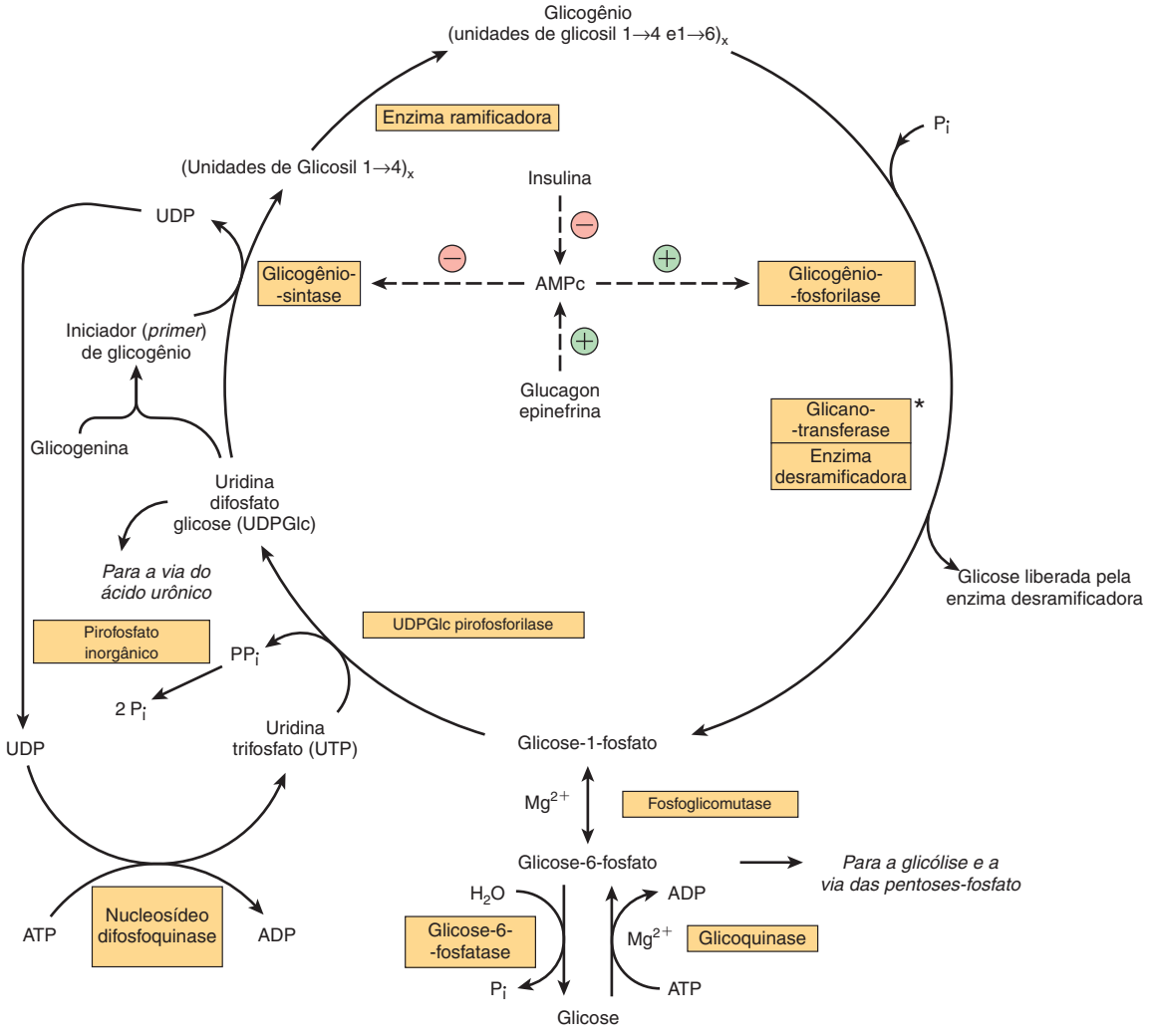


FIGURA 19-1 Vias de glicogênese e de glicogenólise no fígado. (⊕, estimulação; ⊖, inibição.) A insulina diminui o nível de AMPc somente após ter sido elevado pelo glucagon ou pela epinefrina, isto é, ela antagoniza suas ações. O glucagon é ativo no músculo cardíaco, mas não no músculo esquelético. *A glicano-transferase e a enzima desramificadora parecem ser duas atividades distintas da mesma enzima.

As etapas iniciais na síntese de glicogênio envolvem a proteína **glicogenina,** uma proteína de 37 kDa que é glicosilada em um resíduo de tirosina específico pela UDPGlc. A glicogenina catalisa a transferência de mais sete resíduos de glicose da UDPGlc, em ligação 1 → 4, formando um **iniciador** (***primer***) **de glicogênio**, que é o substrato da glicogênio-sintase. No músculo, a glicogenina permanece no centro do grânulo de glicogênio (Figura 14-13); todavia, no fígado, muitos grânulos de glicogênio não apresentam uma molécula de glicogenina central. A **glicogênio-sintase** catalisa a formação de uma ligação glicosídica entre o C-1 de glicose da UDPGlc e o C-4 de um resíduo terminal de glicose do glicogênio, liberando uridina difosfato (UDP). A adição de um resíduo de glicose a uma cadeia de glicogênio preexistente, ou "iniciador" (*primer*), ocorre na extremidade externa não redutora da molécula, com consequente alongamento dos ramos da molécula de glicogênio à medida que são formadas ligações 1 → 4 sucessivas (**Figura 19-3**).

A ramificação envolve a separação das cadeias de glicogênio existentes

Quando a cadeia em crescimento tem um comprimento de pelo menos 11 resíduos de glicose, uma **enzima ramificadora** transfere uma parte da cadeia 1 → 4 (pelo menos seis resíduos de glicose) para uma cadeia adjacente, formando uma ligação 1 → 6, estabelecendo um **ponto de ramificação**. Os ramos crescem por adições subsequentes de unidades glicosil 1 → 4 e ramificações adicionais.

A GLICONEOGÊNESE NÃO É O REVERSO DA GLICOGÊNESE, PORÉM UMA VIA SEPARADA

A **glicogênio fosforilase** catalisa a etapa limitadora de velocidade da glicogenólise – a clivagem fosforolítica (fosforólise; comparar com hidrólise) das ligações 1 → 4 do glicogênio, produzindo glicose-1-fosfato (**Figura 19-4**). Existem isoenzimas distintas da glicogênio fosforilase no fígado, no músculo e no cérebro, que são codificadas por genes distintos. A glicogênio fosforilase requer a presença de piridoxal fosfato (ver Capítulo 44) como coenzima. Diferentemente das reações no metabolismo de aminoácidos

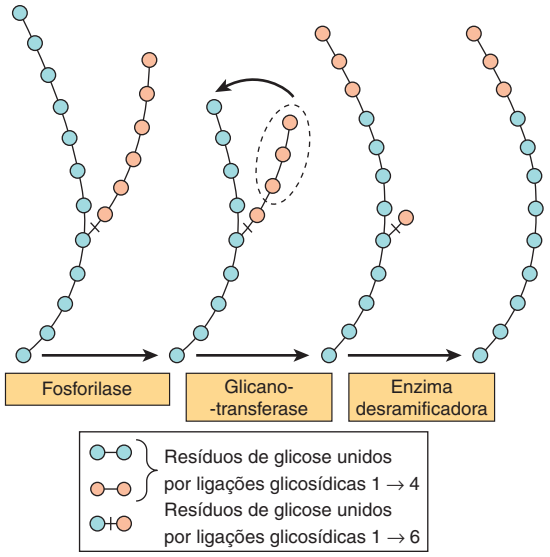


FIGURA 19-4 Etapas da glicogenólise.

(Capítulo 29), em que o aldeído é grupo reativo, na fosforilase, é o grupo fosfato que é cataliticamente ativo.

Os resíduos glicosil terminais das cadeias mais externas da molécula de glicogênio são removidos de modo sequencial até restar aproximadamente quatro resíduos de glicose em cada um dos lados de uma ramificação 1 → 6 (Figura 19-4). A **enzima desramificadora** possui dois sítios catalíticos distintos em uma única cadeia polipeptídica. Um deles é uma glicano-transferase, que transfere uma unidade trissacarídica de uma ramificação para outra, expondo o ponto de ramificação 1 → 6. O outro é uma 1,6-glicosidase, que catalisa a hidrólise da ligação glicosídica 1 → 6, com liberação de glicose livre. A ação subsequente da fosforilase pode então ocorrer. A ação combinada da fosforilase e dessas outras enzimas leva à degradação completa do glicogênio.

A reação catalisada pela fosfoglicomutase é reversível, de modo que a glicose-6-fosfato possa ser formada a partir da glicose-1-fosfato. No **fígado**, mas não no músculo, a **glicose-6-fosfatase** catalisa a hidrólise da glicose-6-fosfato, produzindo glicose que é exportada, com consequente aumento no nível de

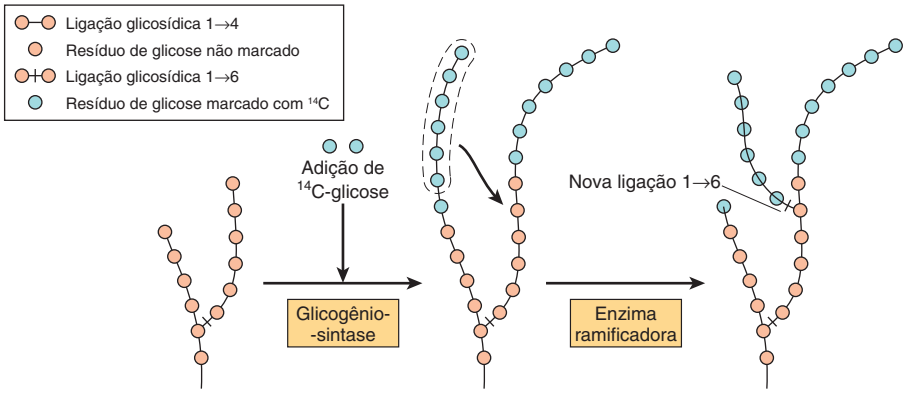


FIGURA 19-3 Biossíntese do glicogênio. Mecanismo de ramificação, conforme revelado pela ingestão de glicose marcada com ^{14}C e exame do glicogênio hepático a intervalos.

TABELA 19-2 Doenças de armazenamento de glicogênio

Tipo	Nome	Deficiência enzimática	Manifestações clínicas
0	—	Glicogênio-sintase	Hipoglicemia, hipercetonemia; morte precoce
Ia	Doença de von Gierke	Glicose-6-fosfatase	Acúmulo de glicogênio nas células hepáticas e nas células tubulares renais; hipoglicemia; acidemia láctica; cetose; hiperlipemia
Ib	—	Transportador de glicose-6-fosfato do retículo endoplasmático	Iguais às do tipo Ia; neutropenia e comprometimento da função dos neutrófilos, resultando em infecções recorrentes
II	Doença de Pompe	$\alpha_1 \rightarrow 4$ e $\alpha_1 \rightarrow 6$ glicosidases lisossomais (maltase ácida)	Acúmulo de glicogênio nos lisossomos: variante de início juvenil, hipotonia muscular, morte por insuficiência cardíaca em torno dos 2 anos de idade; variante de início adulto, distrofia muscular
IIIa	Dextrinose limite, doença de Forbe ou de Cori	Enzima desramificadora hepática e muscular	Hipoglicemia em jejum; hepatomegalia na lactância; acúmulo de polissacarídeo ramificado característico (dextrina limite); fraqueza muscular
IIIb	Dextrinose limite	Enzima desramificadora hepática	Iguais às do tipo IIIa, porém sem fraqueza muscular
IV	Amilopectinose, doença de Andersen	Enzima ramificadora	Hepatoesplenomegalia; acúmulo de polissacarídeo ou poucos pontos de ramificação; morte por insuficiência cardíaca ou hepática antes dos 5 anos de idade
V	Deficiência de miofosforilase, síndrome de McArdle	Fosforilase muscular	Pouca tolerância ao exercício; glicogênio muscular anormalmente alto (2,5 a 4%); nível sanguíneo de lactato muito baixo após o exercício
VI	Doença de Hers	Fosforilase hepática	Hepatomegalia; acúmulo de glicogênio no fígado; hipoglicemia leve; geralmente com bom prognóstico
VII	Doença de Tarui	Fosfofrutoquinase muscular e eritrocitária 1	Pouca tolerância ao exercício; glicogênio muscular anormalmente alto (2,5 a 4%); nível sanguíneo de lactato muito baixo após o exercício; ocorrência também de anemia hemolítica
VIII		Fosforilase-quinase hepática	Hepatomegalia; acúmulo de glicogênio no fígado; hipoglicemia leve; geralmente com bom prognóstico
IX		Fosforilase-quinase hepática e muscular	Hepatomegalia; acúmulo de glicogênio no fígado; hipoglicemia leve; geralmente com bom prognóstico
X		Proteinoquinase A dependente de AMPc	Hepatomegalia; acúmulo de glicogênio no fígado

glicemia. A glicose-6-fosfatase encontra-se no lúmen do retículo endoplasmático liso, e defeitos genéticos do transportador de glicose-6-fosfato podem causar uma variante da doença de armazenamento do glicogênio tipo I (ver **Tabela 19-2**).

Os grânulos de glicogênio também podem ser englobados por **lisossomos**, onde a maltase ácida catalisa a hidrólise do glicogênio em glicose. Isso pode ser particularmente importante na homeostasia da glicose em recém-nascidos; entretanto, a ausência genética de maltase ácida lisossomal leva à doença de armazenamento do glicogênio tipo II (doença de Pompe, Tabela 19-2). O catabolismo lisossomal do glicogênio encontra-se sob controle hormonal.

O AMP CÍCLICO INTEGRA A REGULAÇÃO DA GLICOGENÓLISE E DA GLICOGÊNESE

As principais enzimas que controlam o metabolismo do glicogênio – a glicogênio-fosforilase e a glicogênio-sintase – são reguladas em direções opostas por mecanismos alostéricos e modificações covalentes por fosforilação e desfosforilação reversíveis da enzima em resposta à ação hormonal (Capítulo 9). A fosforilação da glicogênio-fosforilase aumenta a sua atividade, enquanto a da glicogênio sintase a reduz.

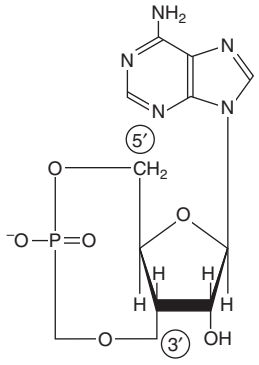


FIGURA 19-5 Ácido 3′,5′-adenílico (AMP cíclico; AMPc).

A fosforilação aumenta em resposta ao AMP cíclico (AMPc) (**Figura 19-5**) formado a partir do ATP pela **adenilil-ciclase** à superfície interna das membranas celulares, em resposta a hormônios como a **epinefrina**, a **norepinefrina** e o **glucagon**. O AMPc é hidrolisado pela **fosfodiesterase**, interrompendo, assim, a ação hormonal; no fígado, a insulina aumenta a atividade da fosfodiesterase.

O controle da glicogênio-fosforilase difere entre o fígado e o músculo

No fígado, o papel do glicogênio consiste em fornecer glicose livre para exportação, a fim de manter o nível de glicemia; no músculo, o papel do glicogênio é fornecer uma fonte de glicose-6-fosfato para a glicólise, em resposta à necessidade de ATP durante a contração muscular. Em ambos os tecidos, a enzima é ativada por fosforilação catalisada pela fosforilase-quinase (produzindo fosforilase a) e inativada por desfosforilação catalisada pela fosfoproteína fosfatase (produzindo fosforilase b), em resposta a sinais hormonais e a outros sinais.

Ocorre supressão instantânea desse controle hormonal. Em ambos os tecidos, a fosforilase a ativa sofre inibição alostérica pelo ATP e pela glicose-6-fosfato; no fígado, mas não nos músculos, a glicose livre também é um inibidor. A fosforilase muscular difere da isoenzima hepática pela presença de um sítio de ligação para o 5′ AMP, que atua como ativador alostérico da forma b desfosforilada (inativa) da enzima. O 5′ AMP atua como poderoso sinal do estado de energia da célula muscular; é formado à medida que a concentração de ADP começa a aumentar (indicando a necessidade de elevação do metabolismo do substrato para possibilitar a formação de ATP), em consequência da reação da adenilato-quinase: $2 \times ADP \leftrightarrow ATP + 5'\ AMP$.

O AMPc ativa a glicogênio fosforilase

A fosforilase-quinase é ativada em resposta ao AMPc (**Figura 19-6**). O aumento da concentração de AMPc ativa a **proteína quinase dependente de AMPc**, que catalisa a fosforilação pelo ATP da **fosforilase-quinase b** inativa à **fosforilase-quinase a** ativa, a qual, por sua vez, fosforila a fosforilase b para formar fosforilase a. No fígado, ocorre formação de AMPc em resposta ao glucagon, que é secretado em resposta à queda do nível de glicemia. O músculo é insensível ao glucagon; no músculo, o sinal para a formação aumentada de AMPc é a ação da norepinefrina, que é secretada em resposta ao medo ou pavor, quando existe a necessidade de aumentar a glicogenólise para possibilitar uma rápida atividade muscular.

O Ca^{2+} sincroniza a ativação da glicogênio fosforilase com a contração muscular

A glicogenólise no músculo aumenta várias centenas de vezes no início da contração; o mesmo sinal (aumento da concentração citosólica de íon Ca^{2+}) é responsável pelo início da contração e da glicogenólise. A fosforilase-quinase muscular, que ativa a glicogênio-fosforilase, é um tetrâmero constituído de quatro subunidades diferentes, α, β, γ e δ. As subunidades α e β contêm resíduos de serina, que são fosforilados pela proteinoquinase dependente de AMPc. A subunidade δ é idêntica à proteína de ligação de Ca^{2+}, a **calmodulina** (Capítulo 42), e liga-se a quatro Ca^{2+}. A ligação do Ca^{2+} ativa o sítio catalítico da subunidade γ, mesmo enquanto a enzima se encontra no estado b desfosforilado; a forma a fosforilada só é totalmente ativada na presença de altas concentrações de Ca^{2+}.

A glicogenólise no fígado pode ser independente de AMPc

No fígado, ocorre ativação da glicogenólise independente de AMPc em resposta à estimulação dos receptores **α_1-adrenérgicos** pela epinefrina e norepinefrina. Isso envolve a mobilização do Ca^{2+} no citosol, seguida de estimulação de uma **fosforilase-quinase sensível à Ca^{2+}/calmodulina**. A glicogenólise independente de AMPc também é ativada pela vasopressina, ocitocina e angiotensina II, atuando por intermédio do cálcio ou da via do fosfatidilinositol bifosfato (Figura 42-10).

A proteína fosfatase-1 inativa a glicogênio fosforilase

Tanto a fosforilase a quanto a fosforilase-quinase a são desfosforiladas e inativadas pela **proteína fosfatase-1**. A proteína fosfatase-1 é inibida por uma proteína, o **inibidor-1**, que só é ativo após ter sido fosforilado pela proteinoquinase dependente de AMPc. Assim, o AMPc controla tanto a ativação quanto a inativação da fosforilase (Figura 19-6). A **insulina** reforça esse efeito ao inibir a ativação da fosforilase b, pois ao aumentar a captação de glicose, indiretamente leva à formação aumentada de glicose-6-fosfato, que é um inibidor da fosforilase-quinase.

As atividades da glicogênio sintase e da fosforilase são reguladas de modo recíproco

Existem diferentes isoenzimas da glicogênio sintase no fígado, músculo e cérebro. À semelhança da fosforilase, a glicogênio sintase existe nos estados tanto fosforilado quanto não fosforilado, e o efeito da fosforilação é o inverso daquele observado na fosforilase (**Figura 19-7**). A **glicogênio sintase a** ativa é desfosforilada, enquanto a **glicogênio sintase b** inativa é fosforilada.

Seis proteinoquinases diferentes atuam sobre a glicogênio sintase, e existem pelo menos nove resíduos de serina diferentes na enzima que podem ser fosforilados. Duas das proteínas quinases são dependentes de Ca^{2+}/calmodulina (uma delas é a fosforilase-quinase). Outra quinase é a proteinoquinase dependente de AMPc, que permite que a ação hormonal mediada pelo AMPc iniba a síntese de glicogênio sincronicamente com a ativação da glicogenólise. A insulina também promove a glicogênese no músculo, ao mesmo tempo em que inibe a glicogenólise ao elevar as concentrações de glicose-6-fosfato, estimulando a desfosforilação e ativação da glicogênio sintase. A desfosforilação da glicogênio sintase b é efetuada pela proteína fosfatase-1, que está sob o controle da proteinoquinase dependente de AMPc.

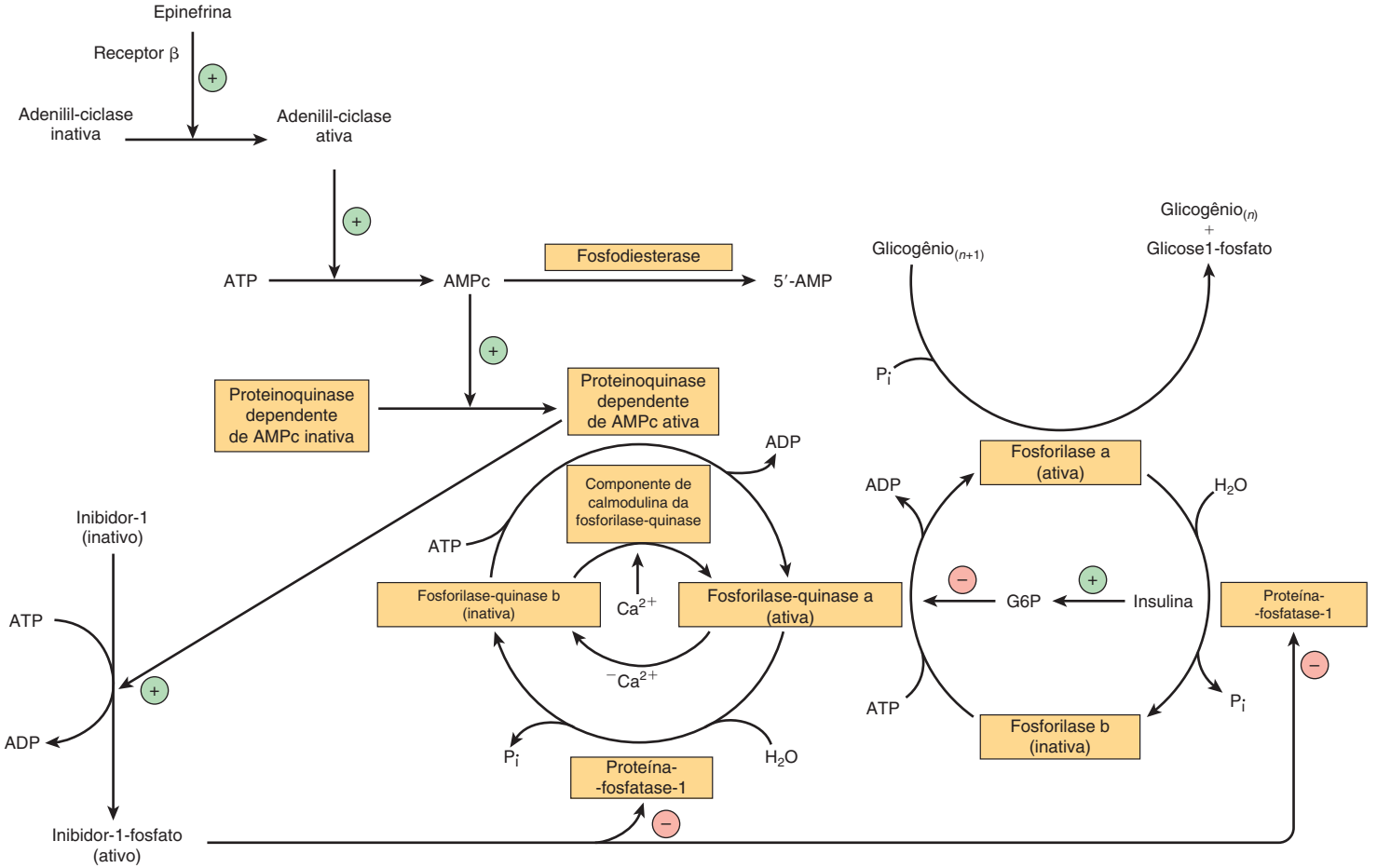


FIGURA 19-6 Controle da fosforilase no músculo. A sequência de reações distribuídas como cascata possibilita a amplificação do sinal hormonal a cada etapa. (G6P, glicose-6-fosfato; *n*, número de resíduos de glicose).

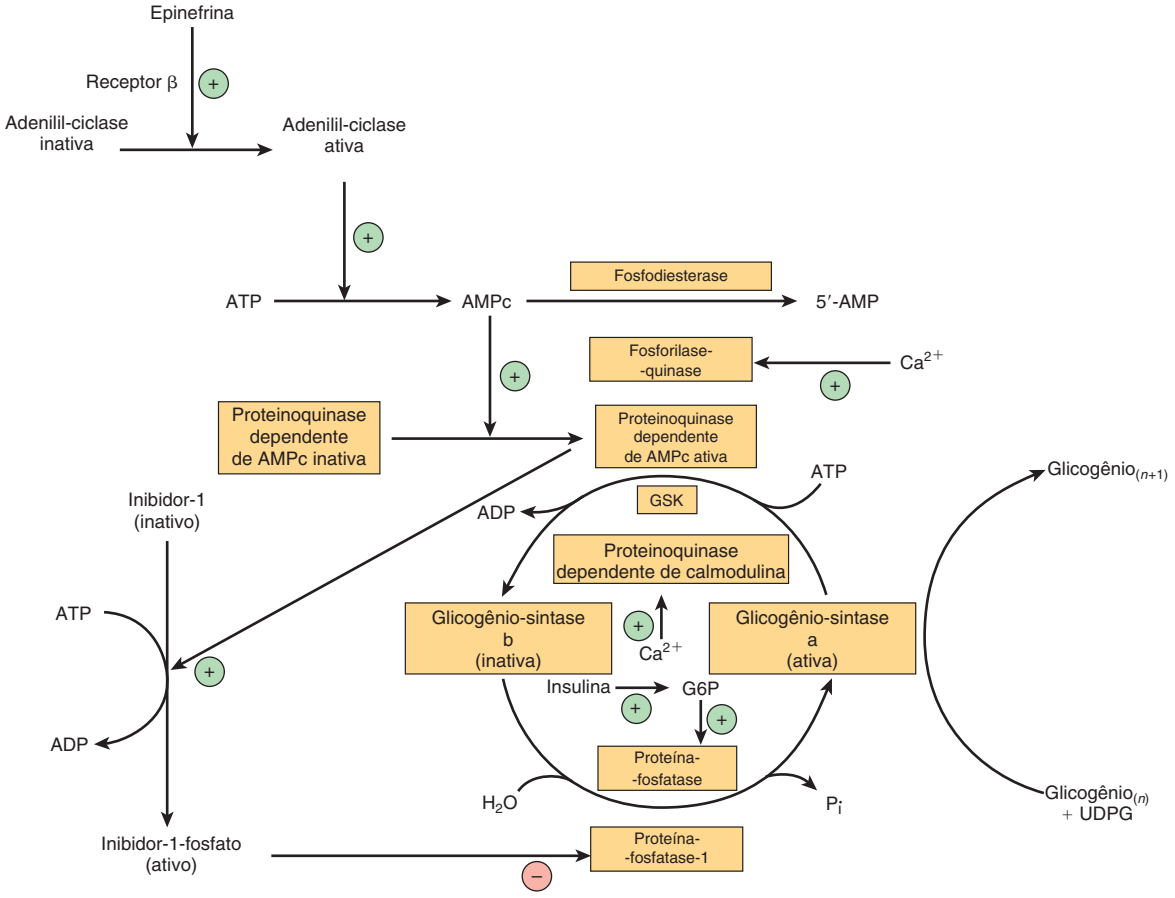


FIGURA 19-7 Controle da glicogênio sintase no músculo. (GSK, glicogênio sintase quinase; G6P, glicose-6-fosfato; *n*, número de resíduos de glicose.)

A REGULAÇÃO DO METABOLISMO DO GLICOGÊNIO É EFETUADA POR UM EQUILÍBRIO ENTRE AS ATIVIDADES DA GLICOGÊNIO SINTASE E DA FOSFORILASE

Ao mesmo tempo em que a fosforilase é ativada por um aumento da concentração de AMPc (pela fosforilase-quinase), a glicogênio-sintase é convertida na forma inativa; ambos os efeitos são mediados pela **proteinoquinase dependente de AMPc** (**Figura 19-8**). Por conseguinte, a inibição da glicogenólise intensifica a glicogênese efetiva, e a inibição da glicogênese potencializa a glicogenólise efetiva. Além disso, a desfosforilação da fosforilase a, da fosforilase-quinase e da glicogênio-sintase b é catalisada por uma única enzima com ampla especificidade – a **proteína-fosfatase-1**. Por sua vez, a proteína fosfatase-1 é inibida pela proteínoquinase dependente de AMPc por meio do inibidor-1. Portanto, a glicogenólise pode ser interrompida, a glicogênese pode ser estimulada, ou vice e versa, sincronicamente, visto que ambos os processos dependem da atividade da proteinoquinase dependente de AMPc. Tanto a fosforilase-quinase quanto a glicogênio-sintase podem ser reversivelmente fosforiladas em mais de um sítio por quinases e fosfatases distintas. Essas fosforilações secundárias modificam a sensibilidade dos sítios primários à fosforilação e desfosforilação (**fosforilação multissítio**). Além disso, possibilitam que a insulina, por meio da elevação da glicose-6-fosfato, exerça efeitos que atuam de modo recíproco aos do AMPc (ver Figuras 19-6 e 19-7).

ASPECTOS CLÍNICOS

As doenças de armazenamento de glicogênio são hereditárias

A "doença de armazenamento de glicogênio" é um termo genérico empregado para descrever um grupo de distúrbios hereditários, caracterizados pelo depósito de um tipo ou quantidade anormais de glicogênio nos tecidos ou pela incapacidade de mobilizar o glicogênio. As principais doenças estão resumidas na Tabela 19-2.

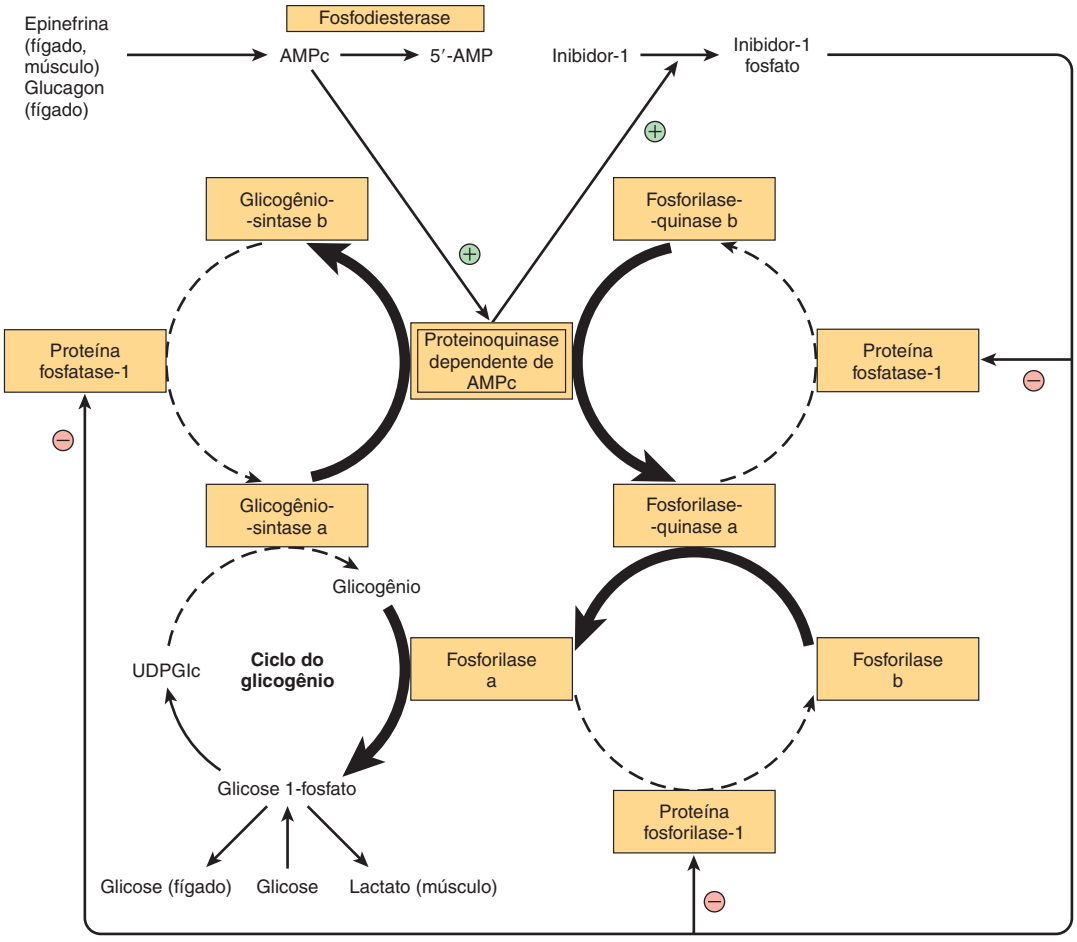


FIGURA 19-8 Controle coordenado da glicogenólise e da glicogênese pela proteinoquinase dependente de AMPc. As reações que levam à glicogenólise em consequência de um aumento nas concentrações de AMPc são mostradas com setas em negrito, enquanto aquelas inibidas pela ativação da proteína fosfatase-1 são mostradas com setas tracejadas. Observa-se o inverso quando as concentrações de AMPc diminuem como resultado da atividade da fosfodiesterase, levando à glicogênese.

RESUMO

- O glicogênio representa o principal carboidrato de armazenamento no corpo, principalmente no fígado e no músculo.
- No fígado, sua principal função consiste em fornecer glicose aos tecidos extra-hepáticos. No músculo, serve principalmente como fonte imediata de combustível metabólico para uso no próprio músculo. O músculo carece de glicose-6-fosfato e não pode liberar glicose livre do glicogênio.
- O glicogênio é sintetizado a partir da glicose pela via da glicogênese. É degradado por uma via distinta, a glicogenólise.
- O AMP cíclico integra a regulação da glicogenólise e da glicogênese, promovendo simultaneamente a ativação da fosforilase e a inibição da glicogênio sintase. A insulina atua de modo recíproco, inibindo a glicogenólise e estimulando a glicogênese.
- As deficiências hereditárias de enzimas do metabolismo do glicogênio tanto no fígado quanto no músculo causam as doenças de armazenamento de glicogênio.

REFERÊNCIAS

Alanso MD, Lomako J, Lomako WM, et al: A new look at the biogenesis of glycogen. FASEB J. 1995;9:1126.

Bollen M, Keppens S, Stalmans W: Specific features of glycogen metabolism in the liver. Biochem J 1998;336:19.

Ferrer JC, Favre C, Gomis RR, et al: Control of glycogen deposition. FEBS Lett 2003;546:127–132.

Forde JE, Dale TC: Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate. Cell Mol Life Sci 2007;64:1930.

Graham TE, Yuan Z, Hill AK, et al: The regulation of muscle glycogen: the granule and its proteins. Acta Physiol (Oxf) 2010;199:489.

Greenberg CC, Jurczak MJ, Danos AM, et al: Glycogen branches out: new perspectives on the role of glycogen metabolism in the integration of metabolic pathways. Am J Physiol Endocrinol Metab 2006;291:E1.

Jensen J, Lai YC: Regulation of muscle glycogen synthase phosphorylation and kinetic properties by insulin, exercise, adrenaline and role in insulin resistance. Arch Physiol Biochem 2009;115:13.

Jentjens R, Jeukendrup A: Determinants of post-exercise glycogen synthesis during short-term recovery. Sports Med 2003;33:117.
McGarry JD, Kuwajima M, Newgard CB, et al: From dietary glucose to liver glycogen: the full circle round. Annu Rev Nutr 1987;7:51.
Meléndez-Hevia E, Waddell TG, Shelton ED: Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule. Biochem J 1993;295:477.
Ozen H: Glycogen storage diseases: new perspectives. World J Gastroenterol 2007;13:2541.
Radziuk J, Pye S: Hepatic glucose uptake, gluconeogenesis and the regulation of glycogen synthesis. Diabetes Metab Res Rev 2001;17(4):250.
Roach PJ: Glycogen and its metabolism. Curr Mol Med 2002;2(2):101.
Roden M, Bernroider E: Hepatic glucose metabolism in humans—its role in health and disease. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2003;17:365.
Rybicka KK: Glycosomes—the organelles of glycogen metabolism. Tissue Cell 1996; 28:254.
Shearer J, Graham TE: New perspectives on the storage and organization of muscle glycogen. Can J Appl Physiol 2002;27:179.
Shin YS: Glycogen storage disease: clinical, biochemical, and molecular heterogeneity. Semin Pediatr Neurol 2006;13:115.
Wolfsdorf JI, Holm IA: Glycogen storage diseases. Phenotypic, genetic, and biochemical characteristics, and therapy. Endocrinol Metab Clin North Am 1999;28:801.
Yeaman SJ, Armstrong JL, Bonavaud SM, et al: Regulation of glycogen synthesis in human muscle cells. Biochem Soc Trans 2001;29:537.

CAPÍTULO 20

Gliconeogênese e o Controle da Glicemia

David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Elucidar a importância da gliconeogênese na homeostasia da glicose.
- Descrever a via da gliconeogênese, como as enzimas irreversíveis da glicólise são contornadas e como a glicólise e a gliconeogênese são reguladas de modo recíproco.
- Explicar como a concentração plasmática de glicose é mantida dentro de limites estreitos nos estados alimentado e jejum prolongado.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A gliconeogênese é o processo de síntese de glicose ou de glicogênio a partir de precursores não carboidratos. Os principais substratos são os aminoácidos glicogênicos (Capítulo 29), o lactato, o glicerol e o propionato. O fígado e o rim constituem os principais tecidos gliconeogênicos; o rim pode contribuir com até 40% da síntese total de glicose em jejum e com uma maior porcentagem na condição de jejum prolongado. As enzimas essenciais da gliconeogênese são expressas no intestino delgado, porém não se sabe ao certo se ocorre produção significativa de glicose pelo intestino em jejum.

Um suprimento de glicose é necessário especialmente para o sistema nervoso e os eritrócitos. Depois de uma noite de jejum, a glicogenólise (Capítulo 19) e a gliconeogênese contribuem de modo aproximadamente igual para o nível de glicemia; com a depleção das reservas de glicogênio, a gliconeogênese torna-se progressivamente mais importante.

A falha da gliconeogênese é geralmente fatal. A **hipoglicemia** provoca disfunção cerebral, podendo levar ao coma e à morte. A glicose também é importante para a manutenção dos níveis de intermediários do ciclo do ácido cítrico, até mesmo quando os ácidos graxos constituem a principal fonte de acetil-CoA nos tecidos. Além disso, a gliconeogênese remove o lactato produzido pelo músculo e pelos eritrócitos, bem como o glicerol formado pelo tecido adiposo. Nos ruminantes, o propionato, um produto do metabolismo dos carboidratos no rúmen, é um importante substrato para a gliconeogênese.

Ocorre gliconeogênese excessiva em **pacientes em estado crítico** em resposta à lesão e infecção, contribuindo para a **hiperglicemia**, a qual está associada a um desagradável prognóstico. A hiperglicemia resulta em alterações da osmolalidade dos líquidos orgânicos, comprometimento do fluxo sanguíneo, acidose intracelular e produção aumentada de radicais superóxido (Capítulo 45) com consequente perturbação da função endotelial e do sistema imune e comprometimento da coagulação sanguínea. A gliconeogênese excessiva também representa um fator que contribui para a hiperglicemia no **diabetes tipo 2,** devido ao comprometimento da sensibilidade da gliconeogênese à *downregulation* em resposta à insulina.

A GLICONEOGÊNESE ENVOLVE A GLICÓLISE, O CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO E ALGUMAS REAÇÕES ESPECIAIS

Existem barreiras termodinâmicas para impedir a simples reversão da glicólise

Três reações não equilibradas na glicólise (Capítulo 18), catalisadas pela hexoquinase, fosfofrutoquinase e piruvato-quinase, impedem a reversão simples da glicólise para a síntese de glicose (**Figura 20-1**). São contornadas da seguinte maneira.

Piruvato e fosfoenolpiruvato

A reversão da reação catalisada pela piruvato-quinase na glicólise envolve duas reações endotérmicas. A **piruvato-carboxilase** mitocondrial catalisa a carboxilação do piruvato a oxalacetato, uma reação que necessita de ATP e na qual a vitamina biotina é a coenzima. A biotina liga-se ao CO_2 do bicarbonato na forma de carboxibiotina antes da adição do CO_2 ao piruvato (Figura 44-17). O oxalacetato resultante é reduzido a malato, exportado da mito-

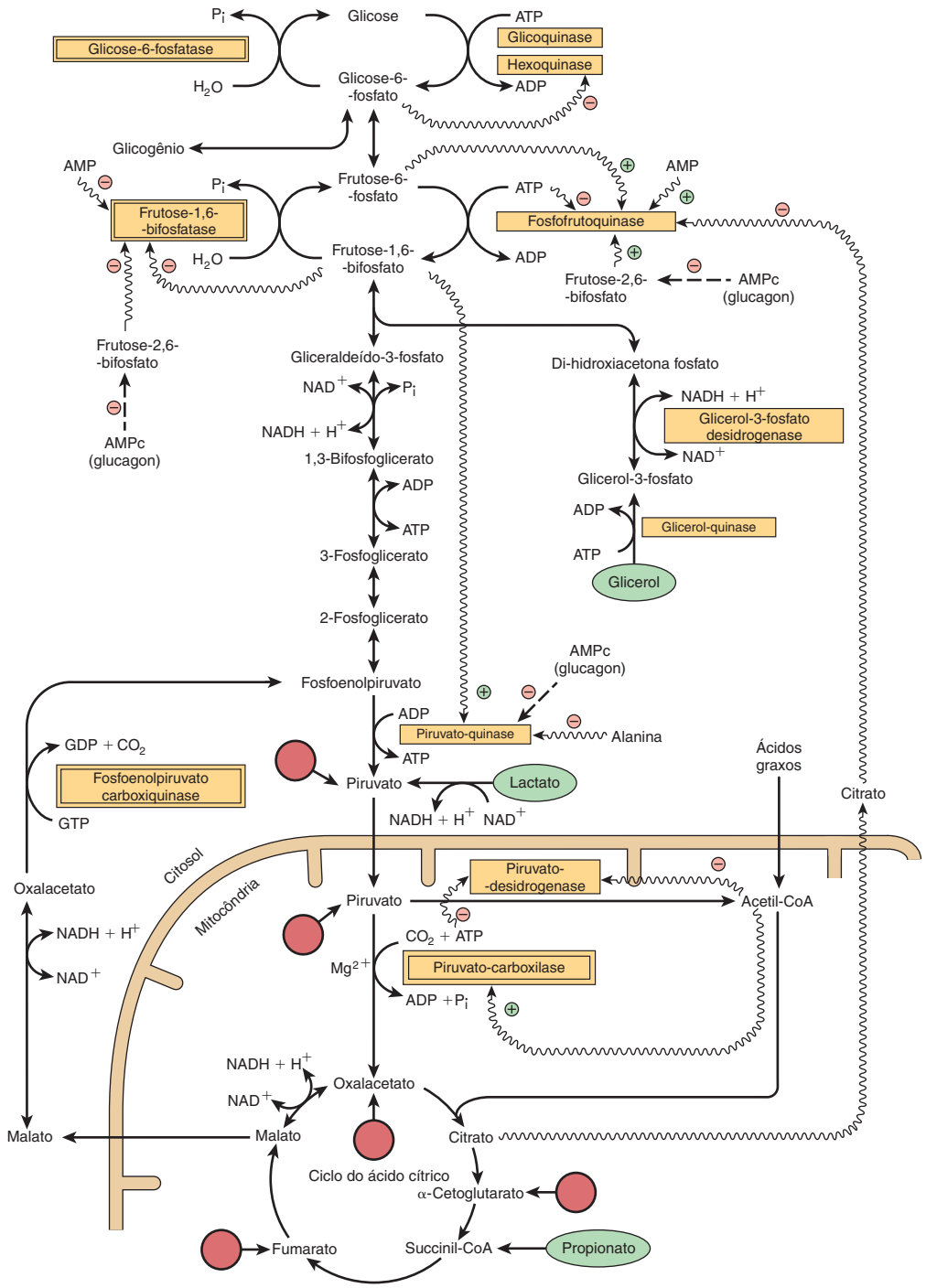


FIGURA 20-1 Principais vias e regulação da gliconeogênese da glicólise no fígado. Os pontos de entrada dos aminoácidos glicogênicos após transaminação estão indicados por setas que se estendem a partir dos círculos (ver também Figura 17-4). As enzimas gliconeogênicas essenciais estão encerradas nos retângulos de duplo contorno. O ATP necessário para a gliconeogênese é fornecido pela oxidação dos ácidos graxos. O propionato apresenta importância quantitativa apenas nos ruminantes. As setas onduladas indicam efeitos alostéricos; as setas tracejadas indicam modificação covalente por fosforilação reversível. A alanina em altas concentrações atua como "sinal gliconeogênico", inibindo a glicólise na etapa da piruvato-quinase.

côndria para o citosol, onde é oxidado de volta a oxalacetato. Uma segunda enzima, a **fosfoenolpiruvato carboxiquinase**, catalisa a descarboxilação e a fosforilação do oxalacetato a fosfoenolpiruvato, utilizando o GTP como doador de fosfato. No fígado e no rim, a reação da succinato-tioquinase no ciclo do ácido cítrico (Capítulo 17) produz GTP (em vez de ATP, conforme observado em outros tecidos), e este é utilizado na reação da fosfoenolpiruvato carboxiquinase, estabelecendo, assim, uma ligação entre a atividade do ciclo do ácido cítrico e a gliconeogênese, de modo a impedir a remoção excessiva de oxalacetato para a gliconeogênese, o que iria comprometer a atividade do ciclo do ácido cítrico.

Frutose-1,6-bifosfato e frutose-6-fosfato

A conversão da frutose-1,6-bifosfato em frutose-6-fosfato para a reversão da glicólise é catalisada pela **frutose-1,6-bifosfotase**. A sua presença determina se um tecido é capaz de sintetizar glicose (ou glicogênio) não apenas a partir do piruvato, mas também a partir de triose-fosfatos. Essa enzima está presente no fígado, no rim e no músculo esquelético, mas provavelmente está ausente no coração e no músculo liso.

Glicose-6-fosfato e glicose

A conversão da glicose-6-fosfato em glicose é catalisada pela **glicose-6-fosfatase**. Essa enzima está presente no fígado e no rim, porém está ausente no músculo e no tecido adiposo que, por esse motivo, são incapazes de exportar glicose na corrente sanguínea.

Glicose-1-fosfato e glicogênio

A degradação do glicogênio em glicose-1-fosfato é catalisada pela fosforilase. A síntese de glicogênio envolve uma via diferente por meio da uridina difosfato glicose e **glicogênio-sintase** (Figura 19-1).

As relações entre a gliconeogênese e a via glicolítica estão ilustradas na Figura 20-1. Após transaminação ou desaminação, os aminoácidos glicogênicos dão origem ao piruvato ou a intermediários do ciclo do ácido cítrico. Assim, as reações anteriormente descritas podem responder pela conversão do lactato e dos aminoácidos glicogênicos em glicose ou glicogênio.

O propionato é um importante precursor da glicose nos ruminantes; entra na gliconeogênese por meio do ciclo do ácido cítrico. Após esterificação com CoA, a propionil-CoA é carboxilada a D-metilmalonil-CoA, em uma reação catalisada pela **propionil-CoA-carboxilase**, uma enzima dependente de biotina (**Figura 20-2**). A **metilmalonil-CoA-racemase** catalisa a conversão da D-metilmalonil-CoA em L-metilmalonil-CoA, que, a seguir, sofre isomerização a succinil-CoA, em uma reação catalisada pela **metilmalonil-CoA-mutase**. Nos animais não ruminantes, incluindo os seres humanos, o propionato surge a partir da β-oxidação dos ácidos graxos de cadeia ímpar que ocorre nos lipídeos dos ruminantes (Capítulo 22), bem como da oxidação da isoleucina e da cadeia lateral do colesterol, e constitui um substrato (relativamente menor) para a gliconeogênese. A metilmalonil-CoA-mutase é uma enzima dependente de vitamina B_{12}, e, na sua deficiência, ocorre excreção de ácido metilmalônico na urina (**acidúria metilmalônica**).

O glicerol é liberado do tecido adiposo em consequência da lipólise do triacilglicerol das lipoproteínas no estado alimentado; pode ser usado para a reesterificação dos ácidos graxos livres em triacilglicerol no tecido adiposo ou no fígado, ou pode constituir um substrato para a gliconeogênese no fígado. Durante o jejum, o glicerol liberado a partir da lipólise do triacilglicerol no tecido adiposo é usado exclusivamente como substrato para a gliconeogênese no fígado e nos rins.

COMO A GLICÓLISE E A GLICONEOGÊNESE COMPARTILHAM A MESMA VIA, PORÉM EM DIREÇÕES OPOSTAS, ELAS PRECISAM SER REGULADAS DE MODO RECÍPROCO

Variações na disponibilidade dos substratos são responsáveis pela maior parte das alterações do metabolismo, atuando direta ou indiretamente por meio de alterações na secreção de hormônios.

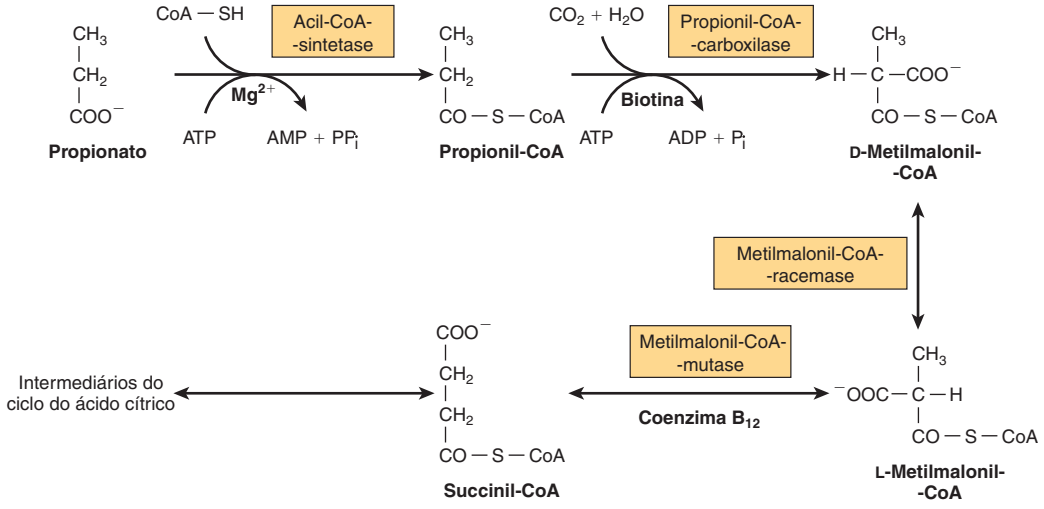


FIGURA 20-2 Metabolismo do propionato.

Três mecanismos são responsáveis pela regulação da atividade das enzimas envolvidas no metabolismo dos carboidratos: (1) alterações na velocidade de síntese das enzimas, (2) modificação covalente por fosforilação reversível, e (3) efeitos alostéricos.

A indução e a repressão das enzimas essenciais exigem várias horas

As mudanças da atividade enzimática no fígado que ocorrem em várias condições metabólicas estão listadas na **Tabela 20-1**. As enzimas envolvidas catalisam reações que não estão em equilíbrio (fisiologicamente irreversíveis). Em geral, os efeitos são reforçados, pois a atividade das enzimas que catalisam as reações em sentido oposto varia de modo recíproco (ver Figura 20-1). As enzimas envolvidas na utilização da glicose (i.e., as da glicólise e da lipogênese) tornam-se mais ativas quando existe um excesso de glicose, e, nessas condições, as enzimas da gliconeogênese apresentam baixa atividade. A insulina, que é secretada em resposta a um aumento da glicemia, intensifica a síntese das enzimas essenciais na glicólise. Ela também antagoniza o efeito dos glicocorticoides e do AMPc estimulado pelo glucagon, que induz a síntese das enzimas-chave da gliconeogênese.

A modificação covalente por fosforilação reversível é rápida

O **glucagon** e a **epinefrina**, hormônios que respondem a uma diminuição do nível de glicemia, inibem a glicólise e estimulam a gliconeogênese no fígado, aumentando a concentração de AMPc. Isso, por sua vez, ativa a proteinoquinase dependente de AMPc, levando à fosforilação e inativação da **piruvato-quinase.** Além disso, o glucagon e a epinefrina afetam a concentração de frutose-2,6-bifosfato e, portanto, a glicólise e a gliconeogênese, conforme descrito adiante.

A modificação alostérica é instantânea

Na gliconeogênese, a piruvato-carboxilase, que catalisa a síntese de oxalacetato a partir do piruvato, requer acetil-CoA como **ativador alostérico**. A adição de acetil-CoA resulta em uma modificação na estrutura terciária da proteína, diminuindo o valor de K_m para o bicarbonato. Isso significa que, à medida que a acetil-CoA é formada a partir do piruvato, ela automaticamente assegura o fornecimento de oxalacetato e, portanto, a sua oxidação posterior no ciclo do ácido cítrico pela ativação da piruvato-carboxilase. A

TABELA 20-1 Enzimas reguladoras e adaptativas associadas ao metabolismo dos carboidratos

	Atividade					
	Na ingestão de carboidratos	No jejum e no diabetes	Indutor	Repressor	Ativador	Inibidor
Glicogenólise, glicólise e oxidação do piruvato						
Glicogênio-sintase	↑	↓			Insulina, glicose-6-fosfato	Glucagon
Hexoquinase						Glicose-6-fosfato
Glicoquinase	↑	↓	Insulina	Glucagon		
Fosfofrutoquinase-1	↑	↓	Insulina	Glucagon	5′AMP, frutose-6-fosfato, frutose-2,6-bifosfato, P_i	Citrato, ATP, glucagon
Piruvato-quinase	↑	↓	Insulina, frutose	Glucagon	Frutose-1,6-bifosfato, insulina	ATP, alanina, glucagon, norepinefrina
Piruvato-desidrogenase	↑	↓			CoA, NAD^+, insulina, ADP, piruvato	Acetil-CoA, NADH, ATP (ácidos graxos, corpos cetônicos)
Gliconeogênese						
Piruvato-carboxilase	↓	↑	Glicocorticoides, glucagon, epinefrina	Insulina	Acetil-CoA	ADP
Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	↓	↑	Glicocorticoides, glucagon, epinefrina	Insulina	Glucagon?	
Glicose-6-fosfatase	↓	↑	Glicocorticoides, glucagon, epinefrina	Insulina		

ativação dessa enzima e a inibição recíproca da piruvato-desidrogenase pela acetil-CoA proveniente da oxidação dos ácidos graxos explicam a ação da oxidação dos ácidos graxos na preservação da oxidação do piruvato e estimulação da gliconeogênese. A relação recíproca entre essas duas enzimas altera o destino metabólico do piruvato à medida que o tecido passa da oxidação dos carboidratos (glicólise) para a gliconeogênese durante a transição do estado alimentado para o jejum (ver Figura 20-1). Um importante papel da oxidação dos ácidos graxos na promoção da gliconeogênese consiste em suprir o ATP necessário.

A **fosfofrutoquinase** (**fosfofrutoquinase-1**) ocupa uma posição fundamental na regulação da glicólise e também está sujeita a controle por retroalimentação. É inibida pelo citrato e por concentrações intracelulares normais de ATP, enquanto é ativada pelo 5′ AMP. O 5′AMP atua como indicador do estado de energia da célula. A presença de **adenilil-quinase** no fígado e em muitos outros tecidos possibilita o rápido equilíbrio da reação.

$$2ADP \leftrightarrow ATP + 5'AMP$$

Por conseguinte, quando o ATP é usado em processos que necessitam de energia, resultando na formação de ADP, ocorre aumento de [AMP]. Uma redução relativamente pequena de [ATP] provoca um aumento considerável de [AMP], de modo que a [AMP] possa atuar como amplificador metabólico de uma pequena alteração da [ATP] e, portanto, como sinal sensível do estado de energia da célula. A atividade da fosfofrutoquinase-1 é, portanto, regulada em resposta ao estado de energia da célula para controlar a quantidade de carboidratos submetidos à glicólise antes de sua entrada no ciclo do ácido cítrico. Simultaneamente, o AMP ativa a fosforilase, aumentando a glicogenólise. Uma consequência da inibição da fosfofrutoquinase-1 consiste no acúmulo de glicose-6-fosfato, que, por sua vez, inibe a captação subsequente de glicose nos tecidos extra-hepáticos por inibição da hexoquinase.

A frutose-2,6-bifosfato desempenha um papel singular na regulação da glicólise e da gliconeogênese no fígado

A **frutose-2,6-bifosfato** constitui o ativador alostérico positivo mais potente da fosfofrutoquinase-1 e o inibidor da frutose-1,6-bifosfato no fígado. A frutose-2,6-bifosfato atenua a inibição da fosfofrutoquinase-1 pelo ATP e aumenta a sua afinidade pela frutose-6-fosfato. Inibe a frutose-1,6-bifosfatase ao aumentar o valor de K_m para a frutose-1,6-bifosfato. Sua concentração está sob controle do substrato (alostérico) e sob controle hormonal (modificação covalente) (**Figura 20-3**).

A frutose-2,6-bifosfato é formada pela fosforilação da frutose-6-fosfato pela ação da **fosfofrutoquinase-2**. A mesma enzima também é responsável pela sua degradação, já que apresenta atividade de **frutose-2,6-bifosfatase**. Essa **enzima bifuncional** está sob controle alostérico da frutose-6-fosfato, que estimula a quinase e inibe a fosfatase. Consequentemente, quando existe um suprimento abundante de glicose, a concentração de frutose-2,6-bifosfato aumenta, estimulando a glicólise ao ativar a fosfofrutoquinase-1 e ao inibir a frutose-1,6-bifosfatase. Durante o jejum, o glucagon estimula a produção de AMPc, ativando a proteinoquinase dependente de AMPc, que, por sua vez, inativa

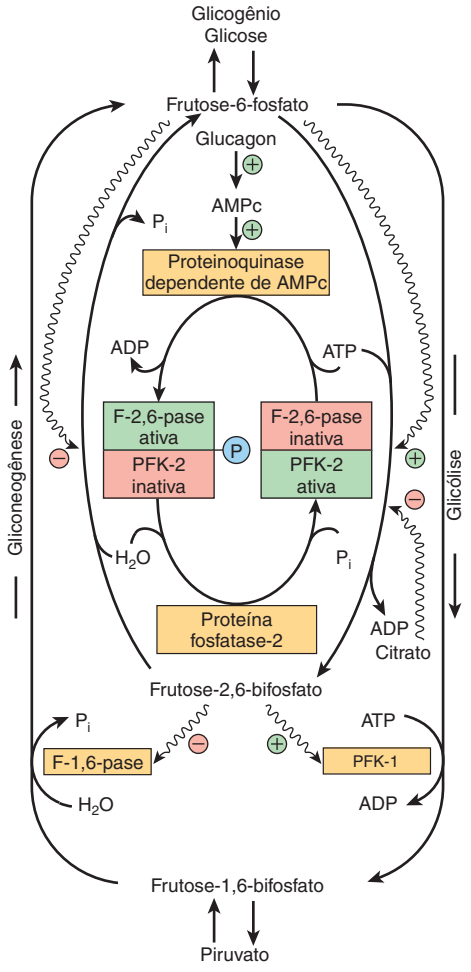


FIGURA 20-3 Controle da glicólise e da gliconeogênese no fígado pela frutose-2,6-bifosfato e pela enzima bifuncional PFK-2/F-2,6-pase (6-fosfofruto-2-quinase/frutose-2,6-bifosfatase). (F-1,6-pase, frutose-1,6-bifosfatase; PFK-1, fosfofrutoquinase-1 [6-fosfofruto-1--quinase].) As setas onduladas indicam efeitos alostéricos.

a fosfofruto-quinase-2 e ativa a frutose-2,6-bifosfatase por fosforilação. Então, a gliconeogênese é estimulada por uma redução da concentração de frutose-2,6-bifosfato, que inativa a fosfofrutoquinase-1 e atenua a inibição da frutose-1,6-bifosfatase. A xilulose-5-fosfato, um intermediário da via de pentose-fosfato (Capítulo 21), ativa a proteína fosfatase que desfosforila a enzima bifuncional, aumentando, assim, a formação de frutose-2,6--bifosfato, bem como a taxa de glicólise. Isso leva a um aumento do fluxo por meio da glicólise e da via das pentoses-fosfato e à síntese aumentada de ácidos graxos (Capítulo 23).

Os ciclos de substrato (fúteis) possibilitam um controle fino e uma resposta rápida

Os pontos de controle na glicólise e no metabolismo do glicogênio envolvem um ciclo de fosforilação e desfosforilação catalisado pela glicoquinase e glicose-6-fosfatase; pela fosfofruto-quinase-1 e frutose-1,6-bifosfato; pela piruvato-quinase, piruvato-carboxilase e fosfoenolpiruvato carboxiquinase; e pela

glicogênio-sintase e fosforilase. Seria aparentemente óbvio que essas enzimas de ação oposta fossem reguladas de tal modo que, quando envolvidas na glicólise estivessem ativas, e quando envolvidas na gliconeogênese estivessem inativas, visto que, de outro modo, haveria um ciclo entre intermediários fosforilados e não fosforilados, com hidrólise final de ATP. Embora isso ocorra, tanto a fosfofruto-quinase quanto a frutose-1,6-bifosfatase no músculo exibem alguma atividade contínua, de modo que existe, de fato, algum grau de ciclo de substratos (com desperdício). Isso permite o aumento muito rápido da taxa de glicólise necessária para a contração muscular. Em repouso, a taxa de atividade da fosfofruto-quinase é cerca de 10 vezes maior que a da frutose-1,6-bifosfatase; na antecipação da contração muscular, a atividade de ambas as enzimas aumenta, a da frutose-1,6-bifosfatase 10 vezes mais que a da fosfofruto-quinase, mantendo a mesma taxa efetiva de glicólise. No início da contração muscular, a atividade da fosfofruto-quinase aumenta ainda mais, enquanto a da frutose-1,6-bifosfatase cai, elevando, assim, a taxa efetiva de glicólise (e, portanto, a formação de ATP) em até 1.000 vezes.

A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE NO SANGUE É REGULADA DENTRO DE LIMITES RESTRITOS

No estado pós-absortivo, a concentração de glicose no sangue da maioria dos mamíferos é mantida entre 4,5 e 5,5 mmol/L. Após a ingestão de uma refeição rica em carboidratos, a concentração pode aumentar para 6,5 a 7,2 mmol/L e, na inanição, pode cair para 3,3 a 3,9 mmol/L. A ocorrência de uma súbita diminuição do nível de glicemia (p. ex., em resposta a uma superdosagem de insulina) provoca convulsões, devido à dependência do cérebro de um suprimento adequado de glicose. Todavia, concentrações muito mais baixas podem ser toleradas quando a hipoglicemia se desenvolve de forma suficientemente lenta para possibilitar a ocorrência de uma adaptação. O nível de glicemia nas aves é consideravelmente mais alto (14,0 mmol/L) e, nos ruminantes, consideravelmente mais baixo (cerca de 2,2 mmol/L nos carneiros e 3,3 mmol/L no gado bovino). Esses níveis normais mais baixos parecem estar associados ao fato de que os ruminantes fermentam praticamente todo o carboidrato da dieta em ácidos graxos de cadeia curta, os quais substituem, em grande parte, a glicose como principal combustível metabólico nos tecidos durante o estado alimentado.

A GLICOSE DO SANGUE ORIGINA-SE DA ALIMENTAÇÃO, DA GLICONEOGÊNESE E DA GLICOGENÓLISE

Os carboidratos digeríveis da alimentação produzem glicose, galactose e frutose, que são transportadas até o fígado pela **veia porta do fígado**. A galactose e a frutose no fígado são prontamente convertidas em glicose (Capítulo 21).

A glicose é formada a partir de dois grupos de compostos que sofrem gliconeogênese (ver Figuras 17-4 e 20-1): (1) os que envolvem uma conversão efetiva direta em glicose, incluindo a maioria dos **aminoácidos** e o **propionato**; e (2) os produtos do metabolismo da glicose nos tecidos. Portanto, o **lactato**, formado pela glicólise no músculo esquelético e nos eritrócitos, é transportado até o fígado e o rim, onde ocorre novamente a formação de glicose, que mais uma vez se torna disponível por intermédio da circulação para oxidação nos tecidos. Esse processo é conhecido como **ciclo de Cori** ou **ciclo do ácido láctico** (**Figura 20-4**).

Durante o jejum, existe uma considerável liberação de alanina do músculo esquelético que ultrapassa acentuadamente a sua concentração nas proteínas musculares que estão sendo catabolizadas. Essa alanina é formada por transaminação do piruvato

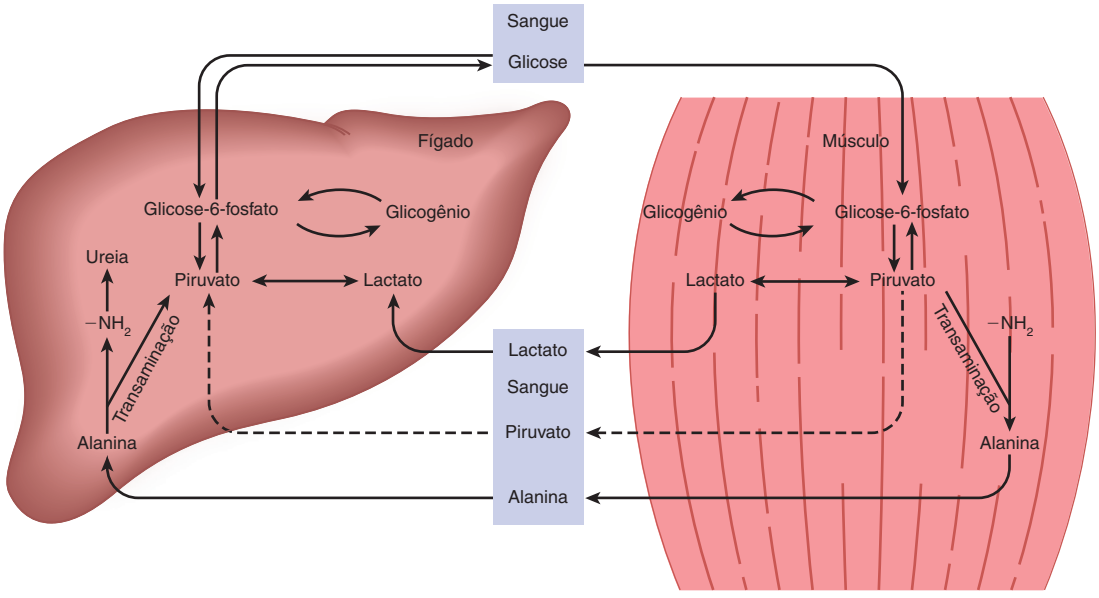


FIGURA 20-4 Os ciclos do ácido láctico (ciclo de Cori) e de glicose-alanina.

produzido pela glicólise do glicogênio muscular e exportada para o fígado, onde, após transaminação de volta ao piruvato, atua como substrato para a gliconeogênese. Esse **ciclo de glicose-alanina** (ver Figura 20-4) proporciona, assim, um meio indireto de utilizar o glicogênio muscular para a manutenção do nível de glicemia em jejum. O ATP necessário para a síntese hepática de glicose a partir do piruvato provém da oxidação dos ácidos graxos.

A glicose também é formada a partir do glicogênio hepático por glicogenólise (Capítulo 19).

A concentração de glicose no sangue é regulada por mecanismos metabólicos e hormonais

A manutenção de níveis estáveis de glicemia constitui, entre todos os mecanismos homeostáticos, um dos mais primorosamente regulados, envolvendo o fígado, os tecidos extra-hepáticos e vários hormônios. As células hepáticas são livremente permeáveis à glicose (por meio do transportador GLUT 2), enquanto as células dos tecidos extra-hepáticos (com exceção das células das ilhotas β do pâncreas) são relativamente impermeáveis, sendo os transportadores de glicose regulados pela insulina. Em consequência, a captação a partir da corrente sanguínea constitui a etapa limitadora de velocidade na utilização da glicose nos tecidos extra-hepáticos. O papel de várias proteínas transportadoras de glicose encontradas nas membranas celulares é apresentado na **Tabela 20-2**.

A glicoquinase é importante na regulação do nível de glicemia após uma refeição

A hexoquinase tem um baixo valor de K_m para a glicose e, no fígado, é saturada e atua em uma velocidade constante em todas as condições normais. A glicoquinase tem um valor de K_m consideravelmente mais alto (menor afinidade) para a glicose, de modo que a sua atividade aumenta com a elevação da concentração de glicose na veia porta do fígado (**Figura 20-5**). A glicoquinase promove a captação hepática de grandes quantidades de glicose após uma refeição rica em carboidratos. Está ausente no fígado dos ruminantes, nos quais apenas uma pequena quantidade de glicose proveniente do intestino penetra na circulação portal.

Na presença de níveis sistêmicos normais de glicose no sangue (4,5 a 5,5 mmol/L), o fígado atua como produtor efetivo de glicose. Entretanto, conforme a elevação do nível de glicose, a produção de glicose cessa, e ocorre captação efetiva.

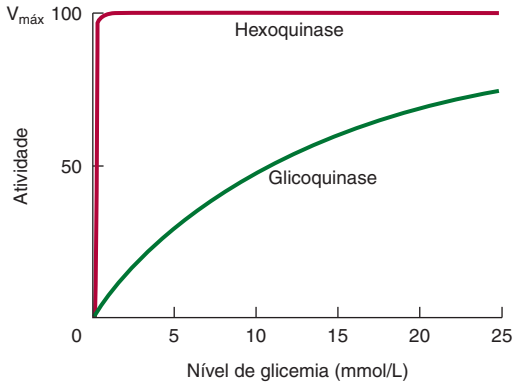


FIGURA 20-5 Variação da atividade da hexoquinase e glicoquinase na fosforilação da glicose com concentrações crescentes de glicose no sangue. A K_m da hexoquinase para a glicose é de 0,05 mmol/L, e a da glicoquinase, de 10 mmol/L.

A insulina desempenha um papel central na regulação da glicemia

Além dos efeitos diretos da hiperglicemia no aumento da captação de glicose pelo fígado, a insulina desempenha um papel central na regulação da glicose no sangue. Esse hormônio é produzido pelas células β das ilhotas de Langerhans no pâncreas, em resposta à hiperglicemia. As células β das ilhotas são livremente permeáveis à glicose via transportador GLUT 2, e a glicose é fosforilada pela glicoquinase. Por conseguinte, o aumento do nível de glicemia aumenta o fluxo metabólico por meio da glicólise, do ciclo do ácido cítrico e da geração de ATP. A elevação da [ATP] inibe os canais de K^+ sensíveis ao ATP, causando despolarização da membrana celular, o que aumenta o influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem, estimulando a exocitose da insulina. Assim, a concentração sanguínea de insulina segue paralela à da glicose no sangue. Outras substâncias que causam a liberação de insulina pelo pâncreas incluem aminoácidos, ácidos graxos livres, corpos cetônicos, glucagon, secretina e as sulfonilureias tolbu-

TABELA 20-2 Principais transportadores de glicose

	Localização tecidual	Funções
Transportadores bidirecionais facilitadores		
GLUT 1	Cérebro, rim, colo, placenta, eritrócitos	Captação de glicose
GLUT 2	Fígado, células β do pâncreas, intestino delgado, rim	Rápida captação ou liberação de glicose
GLUT 3	Cérebro, rim, placenta	Captação de glicose
GLUT 4	Músculos cardíaco e esquelético, tecido adiposo	Captação de glicose estimulada pela insulina
GLUT 5	Intestino delgado	Absorção de glicose
Transportador unidirecional dependente de sódio		
SGLT 1	Intestino delgado e rim	Captação ativa de glicose contra um gradiente de concentração

tamida e gliburida. Esses fármacos são usados para estimular a secreção de insulina no diabetes melito tipo 2 (DMNID, diabetes melito não insulino-dependente) por meio dos canais de K^+ sensíveis ao ATP. A epinefrina e a norepinefrina bloqueiam a liberação de insulina. A insulina diminui imediatamente o nível de glicemia ao intensificar o transporte de glicose no tecido adiposo e no músculo por meio do recrutamento de transportadores da glicose (GLUT 4) do interior da célula para a membrana plasmática. Embora isso não afete diretamente a captação de glicose pelo fígado, a insulina potencializa a captação a longo prazo em consequência de suas ações sobre as enzimas que controlam a glicólise, a glicogênese e a gliconeogênese (Capítulo 19 e Tabela 20-1).

O glucagon opõe-se às ações da insulina

O glucagon é o hormônio produzido pelas células α das ilhotas pancreáticas. Sua secreção é estimulada pela hipoglicemia. No fígado, o glucagon estimula a glicogenólise pela ativação da fosforilase. Diferentemente da epinefrina, o glucagon não exerce nenhum efeito sobre a fosforilase muscular, porém intensifica a gliconeogênese a partir dos aminoácidos e do lactato. Em todas essas ações, o glucagon atua por meio da geração de AMPc (ver Tabela 20-1). Tanto a glicogenólise quanto a gliconeogênese hepáticas contribuem para o **efeito hiperglicêmico** do glucagon, cujas ações se opõem às da insulina. A maior parte do glucagon endógeno (e da insulina) é depurada da circulação pelo fígado (**Tabela 20-3**).

Outros hormônios afetam o nível de glicemia

A **adeno-hipófise** secreta hormônios que tendem a elevar o nível de glicemia e, portanto, a antagonizar a ação da insulina. São eles o hormônio do crescimento, o ACTH (corticotropina) e, possivelmente, outros hormônios "diabetogênicos". A secreção de hormônio do crescimento é estimulada pela hipoglicemia; o hormônio diminui a captação de glicose pelo músculo. Parte desse efeito pode ser indireta, já que o hormônio estimula a mobilização dos ácidos graxos livres do tecido adiposo, os quais inibem a utilização da glicose. Os **glicocorticoides** (11-oxiesteroides) são secretados pelo córtex da suprarrenal e são também sintetizados de modo não regulado no tecido adiposo. Atuam aumentando a gliconeogênese em consequência do aumento do catabolismo hepático dos aminoácidos, em virtude da indução das aminotransferases (e de outras enzimas, como a triptofano-dioxigenase) e das enzimas essenciais da gliconeogênese. Além disso, os glicocorticoides inibem a utilização da glicose nos tecidos extra-hepáticos. Em todas essas ações, os glicocorticoides atuam de modo antagônico à insulina. Diversas **citocinas** secretadas por macrófagos que infiltram o tecido adiposo também exercem ações antagônicas às da insulina; juntamente com os glicocorticoides secretados pelo tecido adiposo, isso explica a resistência à insulina que frequentemente ocorre em indivíduos idosos.

A **epinefrina** é secretada pela medula suprarrenal em consequência de estímulos estressantes (medo, excitação, hemorragia, hipoxia, hipoglicemia, etc) e leva à glicogenólise no fígado e no músculo, devido à estimulação da fosforilase pela geração de AMPc. No músculo, a glicogenólise resulta em aumento da glicólise, ao passo que, no fígado, determina a liberação de glicose na corrente sanguínea.

TABELA 20-3 Respostas dos tecidos à insulina e ao glucagon

	Fígado	Tecido adiposo	Músculo
Aumentadas pela insulina	Síntese de ácidos graxos Síntese de glicogênio Síntese de proteínas	Captação de glicose Síntese de ácidos graxos	Captação de glicose Síntese de glicogênio Síntese de proteínas
Diminuídas pela insulina	Cetogênese Gliconeogênese	Lipólise	
Aumentadas pelo glucagon	Glicogenólise Gliconeogênese Cetogênese	Lipólise	

OUTROS ASPECTOS CLÍNICOS

Ocorre glicosúria quando o limiar renal para a glicose é ultrapassado

Quando a glicemia aumenta e alcança níveis relativamente altos, o rim também exerce um efeito regulador. A glicose é filtrada continuamente pelos glomérulos; todavia, em condições normais, é totalmente reabsorvida nos túbulos renais por transporte ativo. A capacidade do sistema tubular de reabsorver a glicose é limitada a uma taxa de cerca de 2 mmol/min e, na hiperglicemia (como a que ocorre no diabetes melito inadequadamente controlado), o filtrado glomerular pode conter mais glicose do que a que pode ser reabsorvida, resultando em **glicosúria**. Ocorre glicosúria quando a concentração de glicose no sangue venoso ultrapassa cerca de 10 mmol/L, constituindo o denominado **limiar renal** para a glicose.

Pode ocorrer hipoglicemia durante a gravidez e no recém-nascido

Durante a gestação, o consumo fetal de glicose aumenta, e existe um risco de hipoglicemia materna e, possivelmente, fetal, particularmente se houver longos intervalos entre as refeições ou à noite. Além disso, os lactentes prematuros ou com baixo peso ao nascer são mais suscetíveis à hipoglicemia, já que eles têm pouco tecido adiposo para fornecer ácidos graxos livres. As enzimas da gliconeogênese podem não estar totalmente funcionais nessa ocasião, e a gliconeogênese depende, de qualquer modo, de um suprimento de ácidos graxos livres para a obtenção de energia. Existe pouco glicerol, que normalmente seria liberado pelo tecido adiposo, disponível para a gliconeogênese.

A capacidade do corpo de utilizar glicose pode ser avaliada pela determinação da tolerância à glicose

A tolerância à glicose refere-se à capacidade de regular o nível de glicemia após a administração de uma dose de teste de glicose (normalmente 1 g/kg de peso corporal) (**Figura 20-6**). O **diabetes melito** (tipo 1 ou diabetes melito insulino-dependente;

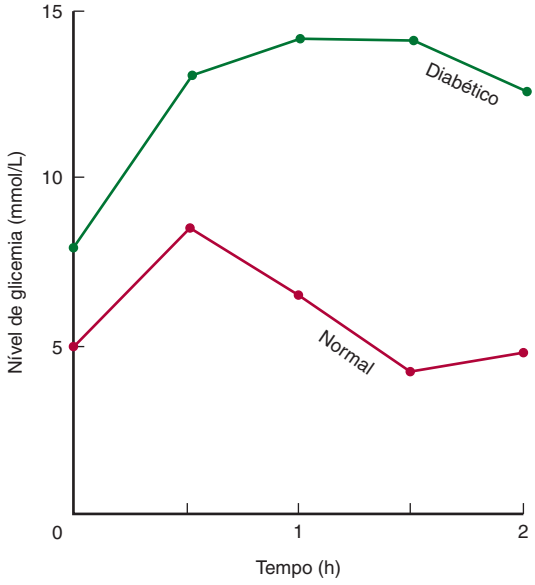


FIGURA 20-6 Teste de tolerância à glicose. As curvas de glicemia de um indivíduo normal e de um diabético após a administração oral de 1 g de glicose/kg de peso corporal. Observe a concentração inicial elevada no diabético em jejum. Um critério de normalidade consiste no retorno da curva a seu valor inicial dentro de 2 h.

DMID) caracteriza-se por uma redução da tolerância à glicose em consequência da secreção diminuída de insulina como resultado da destruição progressiva das células β das ilhotas pancreáticas. A tolerância à glicose também está comprometida no diabetes melito tipo 2 (DMNID), em consequência do comprometimento da sensibilidade dos tecidos à ação da insulina. A resistência à insulina associada à obesidade (e, particularmente, à obesidade abdominal), que leva ao desenvolvimento de hiperlipidemia, seguida de aterosclerose e cardiopatia coronariana, bem como diabetes manifesto, é conhecida como **síndrome metabólica**. Ocorre também comprometimento da tolerância à glicose em condições nas quais o fígado está lesionado, em algumas infecções e em resposta a alguns fármacos, bem como em condições que levam à hiperatividade da hipófise ou do córtex suprarrenal, devido ao antagonismo dos hormônios secretados por essas glândulas à ação da insulina.

A administração de insulina (como no tratamento do diabetes melito) diminui o nível de glicemia e aumenta a utilização e o armazenamento de glicose no fígado e no músculo na forma de glicogênio. A insulina em excesso pode causar **hipoglicemia**, resultando em convulsões e até mesmo em morte, a não ser que a glicose seja imediatamente administrada. Observa-se um aumento da tolerância à glicose na insuficiência hipofisária ou adrenocortical, atribuível a uma diminuição do antagonismo à insulina pelos hormônios normalmente secretados por essas glândulas.

O custo energético da gliconeogênese explica por que as dietas com teor muito baixo de carboidratos promovem a perda de peso

As dietas com teor muito baixo de carboidratos, que fornecem apenas 20 g ou menos de carboidratos por dia (em comparação com uma ingestão desejável de 100 a 120 g/dia), mas que permitem um consumo ilimitado de gorduras e proteínas, têm sido promovidas como um regime efetivo para a perda de peso, embora essas dietas sejam contrárias ao aconselhamento de uma dieta prudente visando à saúde. Como existe uma demanda contínua de glicose, haverá um grau considerável de gliconeogênese a partir dos aminoácidos; o elevado custo associado de ATP deve ser atendido pela oxidação dos ácidos graxos.

RESUMO

- A gliconeogênese é o processo de síntese de glicose ou de glicogênio a partir de precursores não carboidratos. Tem importância particular quando não há disponibilidade de carboidratos na alimentação. Os substratos importantes incluem aminoácidos, lactato, glicerol e propionato.
- A via de gliconeogênese no fígado e no rim utiliza as reações da glicólise que são reversíveis, juntamente com quatro reações adicionais que contornam as reações não equilibradas irreversíveis.
- Como a glicólise e a gliconeogênese compartilham a mesma via, porém operam em direções opostas, suas atividades precisam ser reguladas de modo recíproco.
- O fígado regula o nível de glicemia após uma refeição, pois contém a glicoquinase de alto valor de K_m, que promove um aumento na utilização hepática de glicose.
- A insulina é secretada como resposta direta à hiperglicemia; ela estimula o fígado a armazenar glicose na forma de glicogênio e facilita a captação de glicose nos tecidos extra-hepáticos.
- O glucagon é secretado em resposta à hipoglicemia e ativa tanto a glicogenólise quanto a gliconeogênese no fígado, causando a liberação de glicose no sangue.

REFERÊNCIAS

Barthel A, Schmoll D: Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. Am J Physiol Endocrinol Metab 2003;285:E685.

Boden G: Gluconeogenesis and glycogenolysis in health and diabetes. J Investig Med 2004;52:375.

Dzugaj, A: Localization and regulation of muscle fructose 1,6-bisphosphatase, the key enzyme of glyconeogenesis. Adv Enzyme Regul 2006;46:51.

Jiang G, Zhang BB: Glucagon and regulation of glucose metabolism. Am J Physiol Endocrinol Metab 2003;284:E671.

Jitrapakdee S, Vidal-Puig A, Wallace JC: Anaplerotic roles of pyruvate carboxylase in mammalian tissues. Cell Mol Life Sci 2006;63:843.

Jitrapakdee S, St Maurice M, Rayment, et al: Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. Biochem J 2008;413:369.

Klover PJ, Mooney RA: Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. Int J Biochem Cell Biol 2004;36:753.

McGuinness OP: Defective glucose homeostasis during infection. Ann Rev Nutr 2005;25:9.

Mithiuex G, Andreelli F, Magnan C: Intestinal gluconeogenesis: key signal of central control of energy and glucose homeostasis. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2009;12:419.

Mlinar B, Marc J, Janez A, et al: Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. Clin Chim Acta 2007;375:20.

Nordlie RC, Foster JD, Lange AJ: Regulation of glucose production by the liver. Ann Rev Nutr 1999;19:379.

Pilkis SJ, Claus TH: Hepatic gluconeogenesis/glycolysis: regulation and structure/function relationships of substrate cycle enzymes. Ann Rev Nutr 1991;11:465.

Pilkis SJ, Granner DK: Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. Ann Rev Physiol 1992;54:885.

Postic C, Shiota M, Magnuson MA: Cell-specific roles of glucokinase in glucose homeostasis. Rec Prog Horm Res 2001;56:195.

Previs SF, Brunengraber DZ, Brunengraber H: Is there glucose production outside of the liver and kidney? Ann Rev Nutr 2009;29:43.

Quinn PG, Yeagley D: Insulin regulation of PEPCK gene expression: a model for rapid and reversible modulation. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord 2005;5:423.

Reaven GM: The insulin resistance syndrome: definition and dietary approaches to treatment. Ann Rev Nutr 2005;25:391.

Roden M, Bernroider E: Hepatic glucose metabolism in humans—its role in health and disease. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2003;17:365.

Saggerson D: Malonyl-CoA, a key signaling molecule in mammalian cells. Ann Rev Nutr 2008;28:253.

Schuit FC, Huypens P, Heimberg H, Pipeleers DG: Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothal amus. Diabetes 2001;50:1.

Suh SH, Paik IY, Jacobs K: Regulation of blood glucose homeostasis during prolonged exercise. Mol Cells 2007;23:272.

Wahren J, Ekberg K: Splanchnic regulation of glucose production. Ann Rev Nutr 2007;27:329.

Young, A: Inhibition of glucagon secretion. Adv Pharmacol 2005;52:151.

CAPÍTULO 21

A Via das Pentoses-Fosfato e Outras Vias do Metabolismo das Hexoses

David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever a via das pentoses-fosfato e suas funções como fonte de NADPH e na formação de ribose para a síntese de nucleotídeos.
- Descrever a via do ácido urônico e sua importância na síntese do ácido glicurônico para reações de conjugação e (em animais nos quais não é uma vitamina) vitamina C.
- Descrever e explicar as consequências de um grande consumo de frutose.
- Descrever a síntese e a importância fisiológica da galactose.
- Explicar as consequências dos defeitos genéticos da deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (favismo), da via do ácido urônico (pentosúria) e do metabolismo da frutose e da galactose.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A via das pentoses-fosfato é uma via alternativa para o metabolismo da glicose. Essa via não leva à formação de ATP, porém desempenha duas funções importantes: (1) a formação de **NADPH** para a síntese de ácidos graxos e esteroides e a manutenção da glutationa reduzida para atividade antioxidante e (2) a síntese de **ribose** para a formação de nucleotídeos e ácidos nucleicos. A glicose, a frutose e a galactose são as principais hexoses absorvidas pelo trato gastrintestinal, provenientes do amido, da sacarose e da lactose da dieta, respectivamente. A frutose e a galactose podem ser convertidas em glicose, principalmente no fígado.

A deficiência genética de **glicose-6-fosfato desidrogenase**, a primeira enzima da via das pentoses-fosfato, constitui uma importante causa de hemólise aguda dos eritrócitos, resultando em **anemia hemolítica**. O ácido glicurônico é sintetizado a partir da glicose pela **via do ácido urônico**, de importância quantitativa inferior, porém de grande significado para a conjugação e a excreção de metabólitos e substâncias químicas estranhas (xenobióticos) na forma de **glicuronídeos**. A ocorrência de uma deficiência na via leva à condição de **pentosúria essencial**. A falta de uma enzima da via (gulonolactona oxidase) em primatas e em alguns outros animais explica a razão pela qual o **ácido ascórbico** (vitamina C) constitui uma necessidade nutricional para os seres humanos, mas não para a maioria dos outros mamíferos. Deficiências das enzimas do metabolismo da frutose e da galactose levam ao desenvolvimento de doenças metabólicas, como a **frutosúria essencial**, a **intolerância hereditária à frutose** e a **galactosemia**.

A VIA DAS PENTOSES-FOSFATO GERA NADPH E RIBOSE-FOSFATO

A via das pentoses-fosfato (desvio da hexose-monofosfato) é uma via mais complexa do que a da glicólise (**Figura 21-1**). Três moléculas de glicose-6-fosfato dão origem a três moléculas de CO_2 e a três açúcares de 5 carbonos. Ocorre o rearranjo dessas moléculas para regenerar duas moléculas de glicose-6-fosfato e uma molécula do intermediário glicolítico, o gliceraldeído-3-fosfato. Como duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato podem regenerar a glicose-6-fosfato, a via pode responder pela oxidação completa da glicose.

AS REAÇÕES DA VIA DAS PENTOSES-FOSFATO OCORREM NO CITOSOL

À semelhança da glicólise, as enzimas da via das pentoses-fosfato são citosólicas. Diferentemente da glicólise, entretanto, a oxidação ocorre por desidrogenação, utilizando o **$NADP^+$**, e não o **NAD^+**, como aceptor de hidrogênio. A sequência de reações

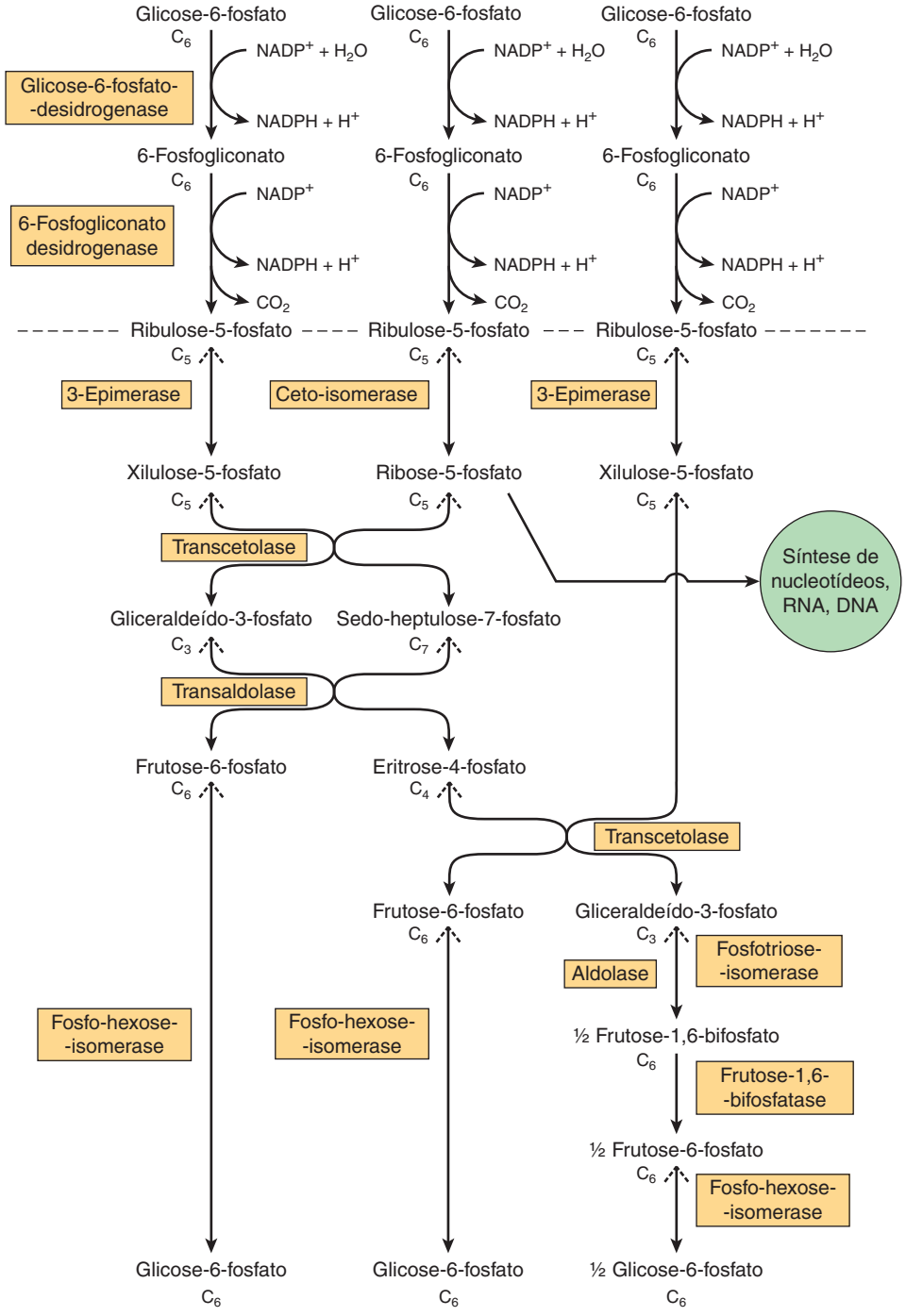


FIGURA 21-1 Fluxograma da via das pentoses-fosfato e suas conexões com a via da glicólise. A via completa, conforme indicada nesta figura, consiste em três ciclos interligados, nos quais a glicose-6-fosfato é tanto substrato quanto produto final. As reações acima da linha tracejada são irreversíveis, enquanto todas as reações abaixo da linha são livremente reversíveis, à exceção daquela catalisada pela frutose-1,6-bifosfatase.

da via pode ser dividida em duas fases: uma **fase oxidativa irreversível** e uma **fase não oxidativa reversível**. Na primeira fase, a glicose-6-fosfato sofre desidrogenação e descarboxilação, produzindo uma pentose, a ribulose-5-fosfato. Na segunda fase, a ribulose-5-fosfato é convertida de volta em glicose-6-fosfato por uma série de reações envolvendo principalmente duas enzimas: a **transcetolase** e a **transaldolase** (ver Figura 21-1).

A fase oxidativa gera NADPH

A desidrogenação da glicose-6-fosfato em 6-fosfogliconato ocorre pela formação da 6-fosfogliconolactona, catalisada pela **glicose-6-fosfato-desidrogenase**, enzima dependente de NADP (**Figuras 21-1** e **21-2**). A hidrólise da 6-fosfogliconolactona é efetuada pela enzima **gliconolactona hidrolase**. Uma segunda etapa oxidativa é catalisada pela **6-fosfogliconato desidrogenase**, que também exi-

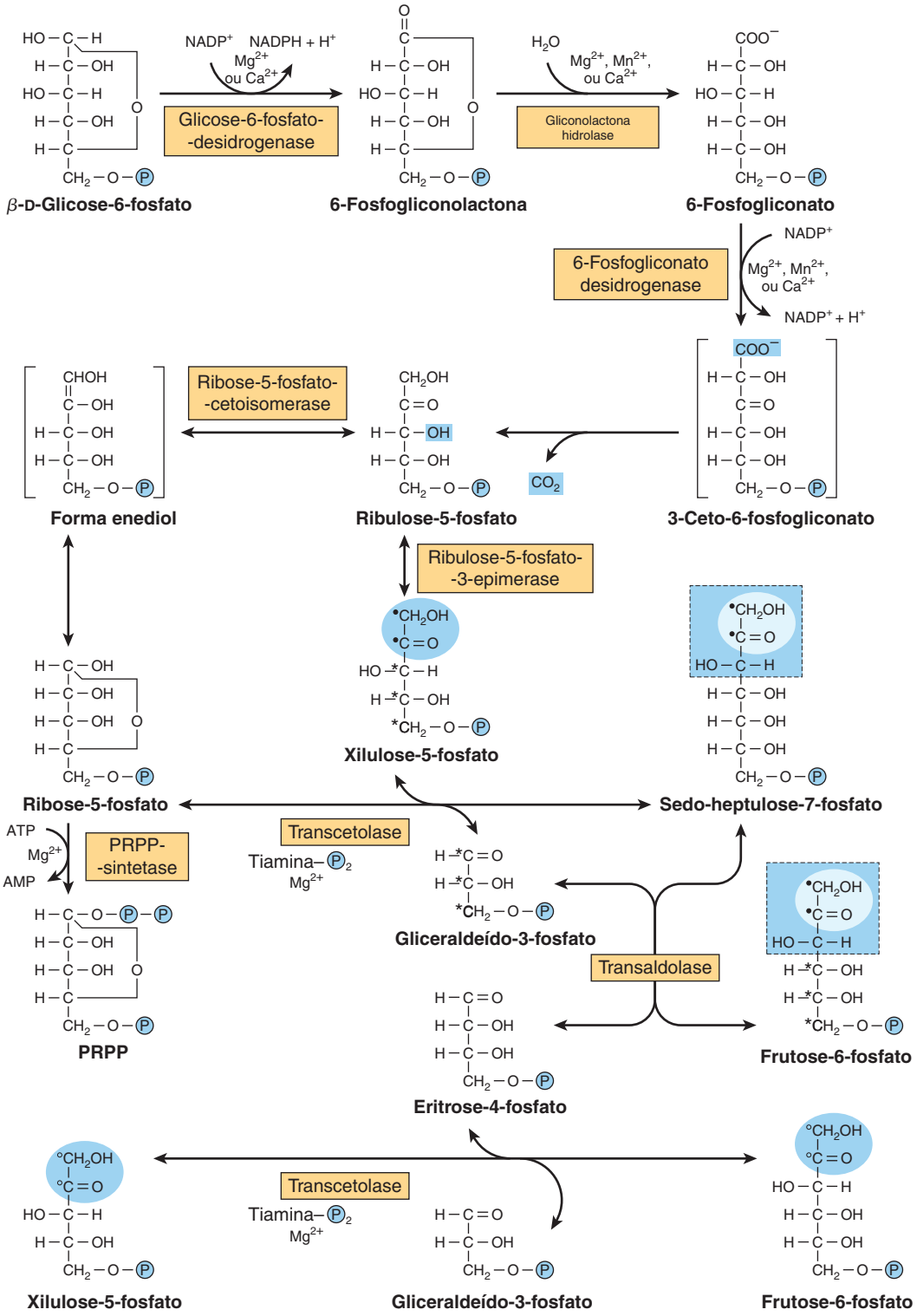


FIGURA 21-2 A via das pentoses-fosfato. (P, $-PO_3^{2-}$; PRPP, 5-fosforribosil-1-pirofosfato.)

ge $NADP^+$ como aceptor de hidrogênio. Segue-se a descarboxilação com a formação da cetopentose, a ribulose-5-fosfato.

No retículo endoplasmático, uma isoenzima da glicose-6--fosfato-desidrogenase, a hexose-6-fosfato-desidrogenase, fornece NADPH para reações de hidroxilação (oxidase de função mista), bem como para a 11-β-hidroxiesteroide-desidrogenase-1. Essa enzima catalisa a redução da cortisona (inativa) em cortisol (ativo) no fígado, no sistema nervoso e no tecido adiposo. Trata-se da principal fonte de cortisol intracelular nesses tecidos, e pode ser importante na obesidade e na síndrome metabólica.

A fase não oxidativa gera precursores de ribose

A ribulose-5-fosfato é o substrato de duas enzimas. A **ribulose-5-fosfato-3-epimerase** altera a configuração em torno do carbono 3, formando o epímero, a xilulose-5-fosfato, que também é uma cetopentose. A **ribose-5-fosfato-cetoisomerase** converte a ribulose-5-fosfato na aldopentose correspondente, a ribose-5-fosfato, que é utilizada na síntese de nucleotídeos e ácidos nucleicos. A **transcetolase** transfere a unidade de dois carbonos, constituída pelos carbonos 1 e 2 de uma cetose, para o carbono aldeído de açúcar aldose. Por conseguinte, afeta a conversão de um açúcar cetose em uma aldose, com dois carbonos a menos, e de um açúcar aldose em uma cetose, com dois carbonos a mais. A reação requer a presença de Mg^{2+} e de **tiamina-pirofosfato** (vitamina B_1) como coenzima. A determinação da transcetolase eritrocitária e sua ativação pela tiamina difosfato fornecem um índice do estado nutricional da vitamina B_1 (Capítulo 44). A fração de dois carbonos transferida consiste provavelmente em glicolaldeído ligado à tiamina difosfato. Dessa forma, a transcetolase catalisa a transferência da unidade de dois carbonos da xilulose-5-fosfato para a ribose-5-fosfato, produzindo uma cetose de sete carbonos, a sedo-heptulose-7-fosfato, e a aldose, gliceraldeído-3-fosfato. Esses dois produtos sofrem, então, transaldolação. A **transaldolase** catalisa a transferência de uma unidade di-hidroxiacetona de três carbonos (carbonos 1 a 3) da cetose, a sedo-heptulose-7-fosfato, para a aldose gliceraldeído-3-fosfato, com formação da cetose frutose-6-fosfato, e de aldose de quatro carbonos, a eritrose-4-fosfato. A transaldolase não tem nenhum cofator, e a reação prossegue por meio da formação intermediária de uma base de Schiff da di-hidroxiacetona com o grupo ε-amino de um resíduo de lisina na enzima. Em uma reação adicional catalisada pela **transcetolase**, a xilulose-5-fosfato serve como doador de glicolaldeído. Neste caso, a eritrose-4-fosfato é o aceptor, e os produtos da reação consistem em frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato.

Para oxidar a glicose por completo em CO_2 pela via das pentoses-fosfato, é necessária a presença de enzimas no tecido para converter o gliceraldeído-3-fosfato em glicose-6-fosfato. Isso envolve a reversão da glicólise e a enzima gliconeogênica, a **frutose-1,6-bifosfatase**. Nos tecidos que carecem dessa enzima, o gliceraldeído-3-fosfato segue a via normal da glicólise a piruvato.

As duas principais vias do catabolismo da glicose têm pouco em comum

Embora a glicose-6-fosfato seja comum a ambas as vias, a via das pentoses-fosfato difere acentuadamente da glicólise. A oxidação utiliza o NADP, em lugar do NAD, e o CO_2, que não é produzido na glicólise, é um produto característico. Não há geração de ATP na via das pentoses-fosfato, já que esse composto constitui um importante produto da glicólise.

Entretanto, as duas vias são conectadas. A xilulose-5-fosfato ativa a proteína fosfatase, que desfosforila a enzima bifuncional 6-fosfofruto-2-quinase/frutose-2,6-bifosfatase (Capítulo 18). Isso ativa a quinase e inativa a fosfatase, levando à formação aumentada de frutose-2,6-bifosfato, aumento da atividade da fosfofrutoquinase-1 e, portanto, aumento do fluxo glicolítico. A xilulose-5-fosfato também ativa a proteína fosfatase que inicia a translocação nuclear e a ligação ao DNA da proteína de ligação do elemento de resposta a carboidratos, com consequente aumento da síntese de ácidos graxos (Capítulo 23) em resposta a uma dieta rica em carboidratos.

Equivalentes redutores são gerados nos tecidos especializados em sínteses redutoras

A via das pentoses-fosfato é ativa no fígado, no tecido adiposo, no córtex suprarrenal, na glândula tireoide, nos eritrócitos, nos testículos e na glândula mamária em lactação. Sua atividade apresenta-se baixa tanto na glândula mamária na ausência de lactação quanto no músculo esquelético. Os tecidos nos quais a via é ativa utilizam o NADPH na síntese redutora, por exemplo, de ácidos graxos, esteroides, aminoácidos por meio da glutamato desidrogenase, e glutationa reduzida. A síntese de glicose-6-fosfato-desidrogenase e de 6-fosfogliconato desidrogenase também pode ser induzida pela insulina no estado prandial, quando a lipogênese aumenta.

A ribose pode ser sintetizada em praticamente todos os tecidos

Pouca ou nenhuma ribose circula na corrente sanguínea, de modo que os tecidos precisam sintetizar a ribose necessária para a síntese de nucleotídeos e ácidos nucleicos usando a via das pentoses-fosfato (ver Figura 21-2). Não há necessidade de ter uma via das pentoses-fosfato totalmente funcional para que um tecido possa sintetizar ribose-5-fosfato. O músculo apresenta apenas uma baixa atividade da glicose-6-fosfato-desidrogenase e 6-fosfogliconato desidrogenase; entretanto, à semelhança da maioria dos outros tecidos, o músculo é capaz de sintetizar a ribose-5-fosfato pela reversão da fase não oxidativa da via das pentoses-fosfato, utilizando a frutose-6-fosfato.

A VIA DAS PENTOSES-FOSFATO E A GLUTATIONA-PEROXIDASE PROTEGEM OS ERITRÓCITOS CONTRA A HEMÓLISE

Nos eritrócitos, a via das pentoses-fosfato constitui a única fonte de NADPH para a redução da glutationa oxidada, catalisada pela **glutationa-redutase**, uma flavoproteína que contém FAD. A glutationa reduzida remove H_2O_2, em uma reação catalisada pela **glutationa-peroxidase**, uma enzima que apresenta o análogo da cisteína contendo **selênio** (selenocisteína) no sítio ativo (**Figura 21-3**). A reação é importante, visto que o acúmulo de H_2O_2 pode diminuir o tempo de sobrevida dos eritrócitos, causando lesão oxidativa na membrana celular com consequente hemólise. Nos outros tecidos, o NADPH também pode ser produzido em uma reação catalisada pela enzima málica.

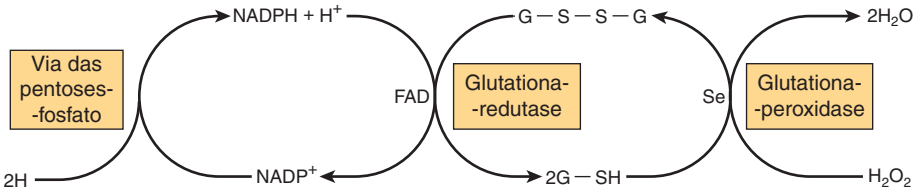


FIGURA 21-3 Papel da via das pentoses-fosfato na reação da glutationa-peroxidase dos eritrócitos. (G-SH, glutationa reduzida; G-S-S-G, glutationa oxidada; Se, enzima contendo selênio).

O GLICURONATO, UM PRECURSOR DOS PROTEOGLICANOS E DOS GLICURONÍDEOS CONJUGADOS, É UM PRODUTO DA VIA DO ÁCIDO URÔNICO

No fígado, a **via do ácido urônico** catalisa a conversão da glicose em ácido glicurônico, ácido ascórbico (exceto nos seres humanos e em outras espécies para os quais o ascorbato é uma vitamina) e em pentoses (**Figura 21-4**). Trata-se também de uma via oxidativa alternativa para a glicose que, à semelhança da via das pentoses-fosfato, não leva à formação de ATP. A glicose-6-fosfato é isomerizada em glicose-1-fosfato, que então reage com uridina-trifosfato (UTP) para formar uridina-difosfato-glicose (UDPGlc), em uma reação catalisada pela **UDPGlc-pirofosforilase,** como a que ocorre na síntese de glicogênio (Capítulo 19). A UDPGlc é oxidada no carbono 6 pela **UDPGlc-desidrogenase** dependente de NAD, em uma reação de duas etapas para produzir UDP-glicuronato.

O UDP-glicuronato constitui a fonte de glicuronato para reações que envolvem a sua incorporação em proteoglicanos, ou para reações com substratos, como hormônios esteroides, bilirrubina e diversos fármacos que são excretados na urina ou na bile na forma de conjugados glicuronídeos (Figura 31-13).

O glicuronato é reduzido a L-gulonato, o precursor direto do **ascorbato** nos animais com capacidade de sintetizar essa vitamina, em uma reação dependente de NADPH. Nos seres humanos e em outros primatas, bem como em cobaias, morcegos e algumas aves e peixes, o ácido ascórbico não pode ser sintetizado, devido à ausência da **L-gulonolactona-oxidase**. O L-gulonato é oxidado a 3-ceto-L-gulonato, que, em seguida, é descarboxilado em L-xilulose. A L-xilulose é convertida no isômero D por uma redução dependente de NADPH em xilitol, seguida de oxidação em D-xilulose, em uma reação dependente de NAD. Após conversão em D-xilulose-5-fosfato, é metabolizada pela via das pentoses-fosfato.

A INGESTÃO DE GRANDES QUANTIDADES DE FRUTOSE TEM CONSEQUÊNCIAS METABÓLICAS PROFUNDAS

As dietas ricas em sacarose ou em xaropes com alto teor de frutose (HFS), usados em alimentos processados e bebidas, resultam em grandes quantidades de frutose (e glicose) que entram na veia porta do fígado.

No fígado, a frutose sofre glicólise de forma mais rápida do que a glicose, visto que ela escapa da etapa reguladora catalisada pela fosfofrutoquinase (**Figura 21-5**). Isso possibilita a saturação das vias do fígado pela frutose, resultando em aumento da síntese de ácido graxos, esterificação dos ácidos graxos e secreção de VLDL, o que pode elevar as concentrações séricas de triacilgliceróis e, por fim, de colesterol LDL. Uma quinase específica, a **frutoquinase**, presente no fígado, no rim e no intestino, catalisa a fosforilação da frutose em frutose-1-fosfato. Essa enzima não atua sobre a glicose, e, diferentemente da glicoquinase, a sua atividade não é afetada pelo jejum nem pela insulina, o que pode explicar por que a frutose é depurada do sangue de pacientes diabéticos em uma taxa normal. A frutose-1-fosfato é clivada em D-gliceraldeído e di-hidroxiacetona fosfato pela **aldolase B**, enzima encontrada no fígado, que também atua na glicólise hepática pela clivagem da frutose-1,6-bifosfato. O D-gliceraldeído entra na glicólise pela fosforilação em gliceraldeído-3-fosfato, catalisada pela **trioquinase**. As duas trioses-fosfato, a di-hidroxiacetona-fosfato e a gliceraldeído-3-fosfato, podem ser degradadas pela glicólise, ou podem atuar como substratos para a aldolase e, portanto, para a gliconeogênese, que é o destino de grande parte da frutose metabolizada no fígado.

Nos tecidos extra-hepáticos, a hexoquinase catalisa a fosforilação da maior parte dos açúcares hexoses, incluindo a frutose, porém a glicose inibe a fosforilação da frutose, visto que ela é um melhor substrato para a hexoquinase. Todavia, alguma frutose pode ser metabolizada no tecido adiposo e no músculo. A frutose é encontrada no plasma seminal e na circulação fetal de ungulados e baleias. A aldose redutase é encontrada na placenta das ovelhas e é responsável pela secreção de sorbitol no sangue fetal. A presença de sorbitol desidrogenase no fígado, incluindo no fígado fetal, é responsável pela conversão do sorbitol em frutose. Essa via também é responsável pela ocorrência de frutose no líquido seminal.

A GALACTOSE É NECESSÁRIA PARA A SÍNTESE DE LACTOSE, GLICOLIPÍDEOS, PROTEOGLICANOS E GLICOPROTEÍNAS

A galactose provém da hidrólise intestinal do dissacarídeo **lactose**, o açúcar do leite. É rapidamente convertida em glicose no

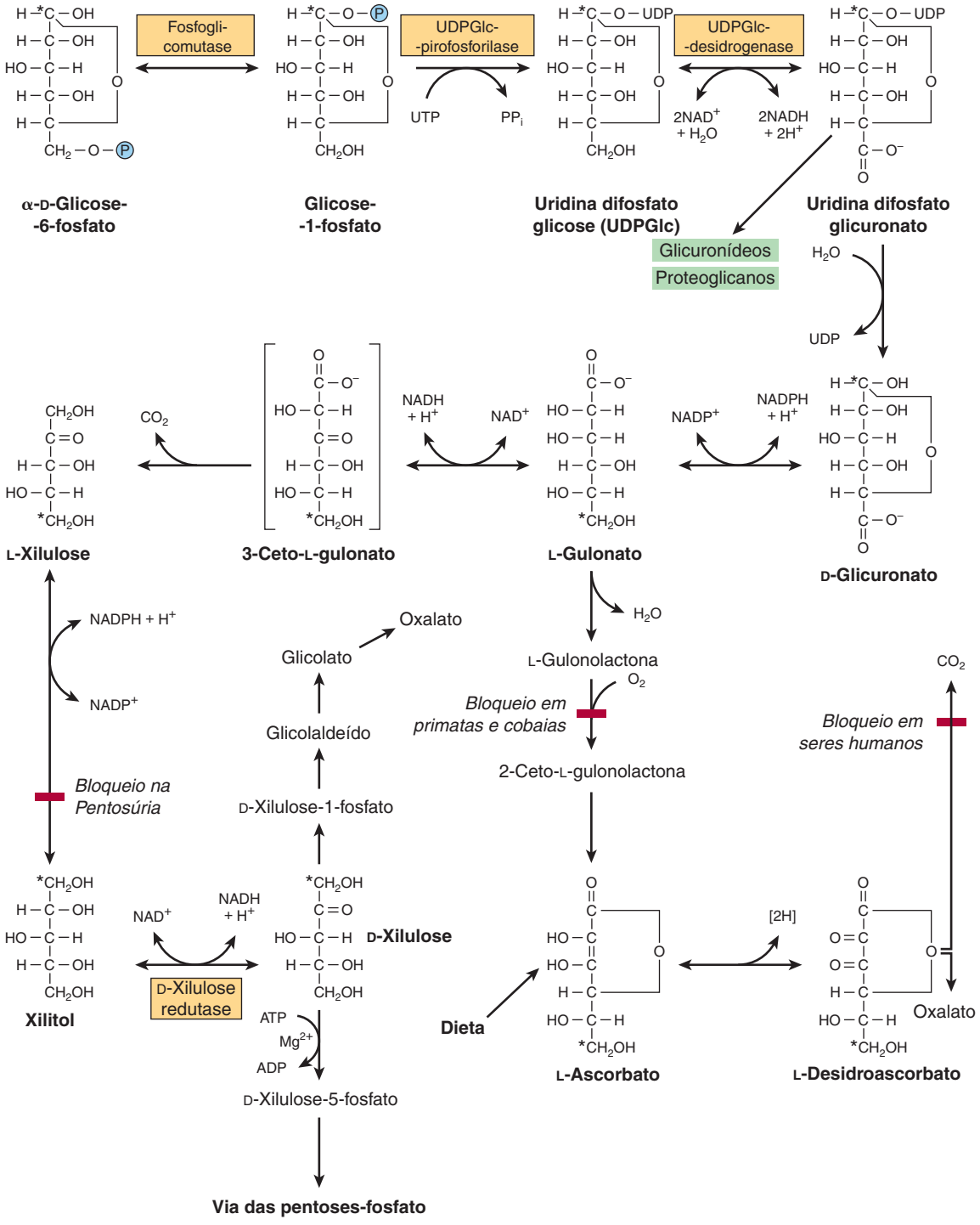


FIGURA 21-4 Via do ácido urônico. (*Indica o destino do carbono 1 da glicose; Ⓟ, $-PO_3^{2-}$.)

fígado. A **galactoquinase** catalisa a fosforilação da galactose, utilizando ATP como doador de fosfato (**Figura 21-6**). A galactose-1-fosfato reage com UDPGlc, formando uridina difosfato galactose (UDPGal) e glicose-1-fosfato, em uma reação catalisada pela **galactose-1-fosfato-uridil-transferase**. A conversão da UDPGal em UDPGlc é catalisada pela **UDPGal 4-epimerase**. A reação envolve oxidação e, em seguida, redução no carbono 4, tendo o NAD^+ como coenzima; a UDPGlc, então, é incorporada ao glicogênio (Capítulo 19).

A reação da epimerase é livremente reversível, de modo que a glicose pode ser convertida em galactose, e a galactose não é um elemento nutricional essencial. A galactose é necessária no corpo não apenas para a formação de lactose na lactação, mas também como constituinte dos glicolipídeos (cerebrosí-

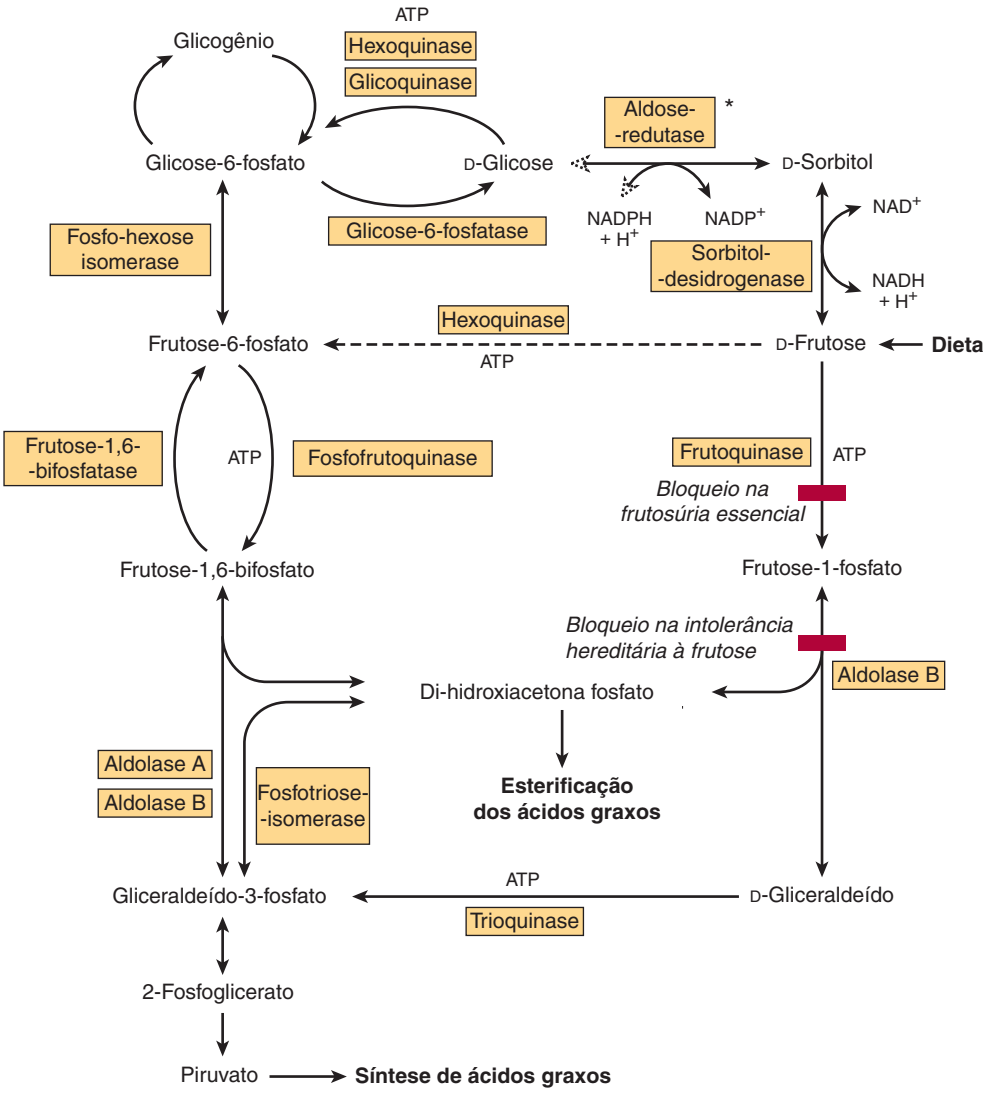


FIGURA 21-5 Metabolismo da frutose. A aldolase A é encontrada em todos os tecidos, enquanto a aldolase B constitui a forma predominante no fígado. (*Não encontrada no fígado.)

deos), proteoglicanos e glicoproteínas. Na síntese de lactose na glândula mamária, a UDPGal condensa-se com a glicose para produzir lactose, em uma reação catalisada pela **lactose-sintase** (ver Figura 21-6).

A glicose é o precursor de aminoaçúcares (hexosaminas)

Os aminoaçúcares são componentes importantes das **glicoproteínas** (Capítulo 47), de certos **glicoesfingolipídeos** (p. ex., gangliosídeos; Capítulo 15) e dos glicosaminoglicanos (Capítulo 48). Os principais aminoaçúcares são as hexosaminas **glicosamina**, **galactosamina** e **manosamina**, bem como o composto de nove carbonos, o **ácido siálico**. O principal ácido siálico encontrado nos tecidos humanos é o ácido *N*-acetilneuramínico (NeuAc). A **Figura 21-7** fornece um resumo das inter-relações metabólicas entre os aminoaçúcares.

ASPECTOS CLÍNICOS

O comprometimento da via das pentoses-fosfato leva à hemólise dos eritrócitos

A ocorrência de defeitos genéticos da glicose-6-fosfato-desidrogenase, com consequente comprometimento na produção de NADPH, é comum em populações de ascendência mediterrânea e afro-caribenha. O gene localiza-se no cromossomo X, de modo que os indivíduos afetados são principalmente do sexo masculino. Cerca de 400 milhões de pessoas são portadoras de mutação do gene para a glicose-6-fosfato desidrogenase, tornando-a o defeito genético mais comum, embora a maioria seja assintomática. Em algumas populações, a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase é comum o suficiente para ser considerada como polimorfismo genético. A distribuição dos genes mutantes equivale à da malária, sugerindo que o estado de heterozigosidade

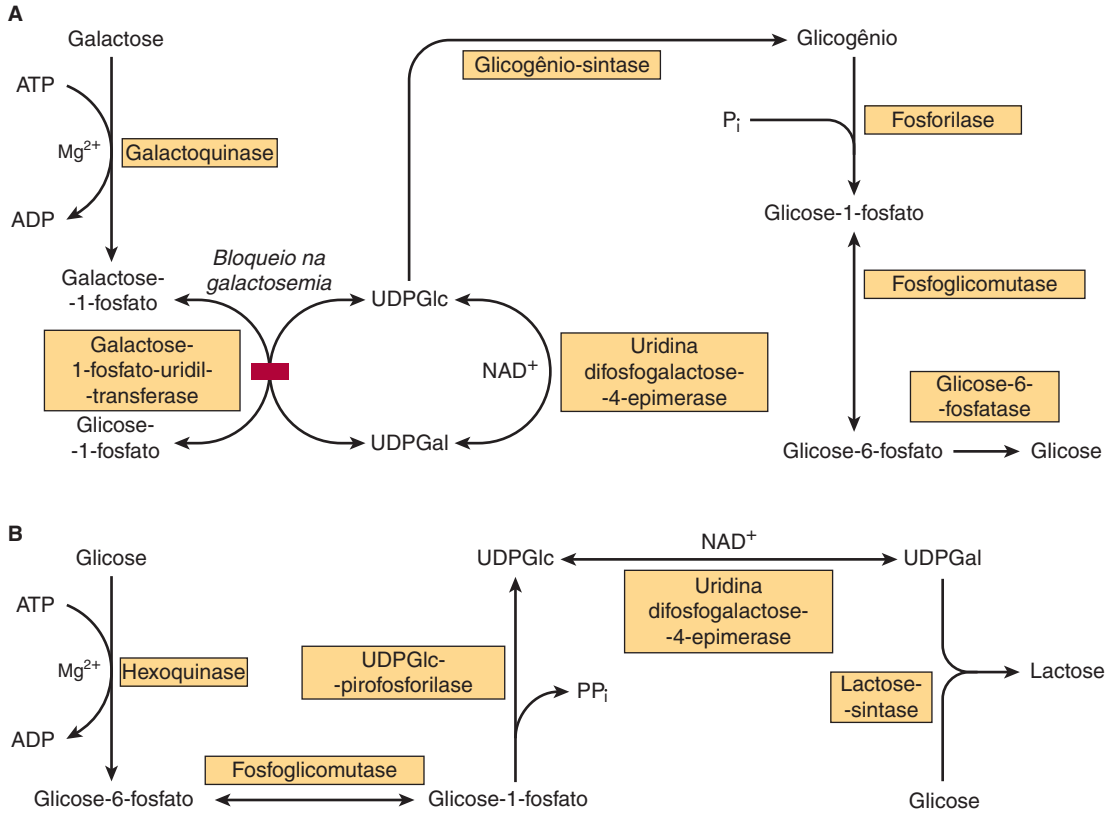


FIGURA 21-6 Via de conversão (A) da galactose em glicose no fígado e (B) da glicose em lactose na glândula mamária em lactação.

confere resistência contra a malária. O defeito manifesta-se como hemólise dos eritrócitos (**anemia hemolítica**) quando indivíduos suscetíveis são submetidos a estresse oxidativo (Capítulo 52) em decorrência de infecção, a fármacos como o antimalárico primaquina e as sulfonamidas, ou quando consomem favas (*Vicia faba* – daí a designação da doença como **favismo**).

Existem duas variantes principais de favismo. Na variante afro-caribenha, a enzima é instável, de modo que, embora a atividade eritrocitária média seja baixa, somente os eritrócitos mais velhos são afetados pelo estresse oxidativo, e as crises hemolíticas tendem a ser autolimitadas. Em contrapartida, na variante mediterrânea, a enzima é estável, porém apresenta baixa atividade em todos os eritrócitos. Nesses indivíduos, as crises hemolíticas são mais graves e podem ser fatais. A glutationa-peroxidase depende de um suprimento de NADPH que, nos eritrócitos, só pode ser formado por meio da via das pentoses-fosfato. A enzima reduz os peróxidos orgânicos e o H_2O_2 como parte da defesa do organismo contra a peroxidação dos lipídeos (Figura 15-21). A determinação da **glutationa-redutase** eritrocitária e a sua ativação por FAD é usada para avaliar o estado nutricional da **vitamina B_2** (Capítulo 44).

O desarranjo da via do ácido urônico é causado por defeitos enzimáticos e por alguns fármacos

Na **pentosúria essencial,** um raro distúrbio hereditário benigno, aparecem quantidades consideráveis de **L-xilulose** na urina, devido à ausência da enzima necessária para a reduzir a xilitol. Embora a pentosúria seja benigna, sem quaisquer consequências clínicas, a xilulose é um açúcar redutor que pode produzir resultados falso-positivos quando se determina a glicose urinária com reagentes alcalinos de cobre. Vários fármacos aumentam a taxa de entrada da glicose na via do ácido urônico. Por exemplo, a administração de barbital ou de clorobutanol em ratos resulta em aumento significativo na conversão da glicose em glicuronato, L-gulonato e ascorbato. A aminopirina e a antipirina aumentam a excreção da L-xilulose em indivíduos com pentosúria. Ocorre também pentosúria após o consumo de quantidades relativamente grandes de frutas, como peras, que constituem fontes ricas de pentose (**pentosúria alimentar**).

A sobrecarga do fígado com frutose pode potencializar a hipertriacilglicerolemia, a hipercolesterolemia e a hiperuricemia

No fígado, a frutose aumenta a síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis e a secreção de VLDL, levando à hipertriacilglicerolemia – e ao aumento do colesterol LDL –, que pode ser considerado como potencialmente aterogênico (Capítulo 26). A razão disso é que a frutose entra na glicólise pela frutoquinase, e a frutose-1-fosfato assim formada escapa da etapa reguladora catalisada pela fosfofrutoquinase (Capítulo 18). Além disso, uma sobrecarga aguda de frutose para o fígado, como a que pode ocorrer com infusão intravenosa ou após um consumo muito alto de frutose, provoca sequestro de fosfato inorgânico na frutose-1-fosfato e diminuição da síntese de ATP. Em consequência, ocorre menor inibição da

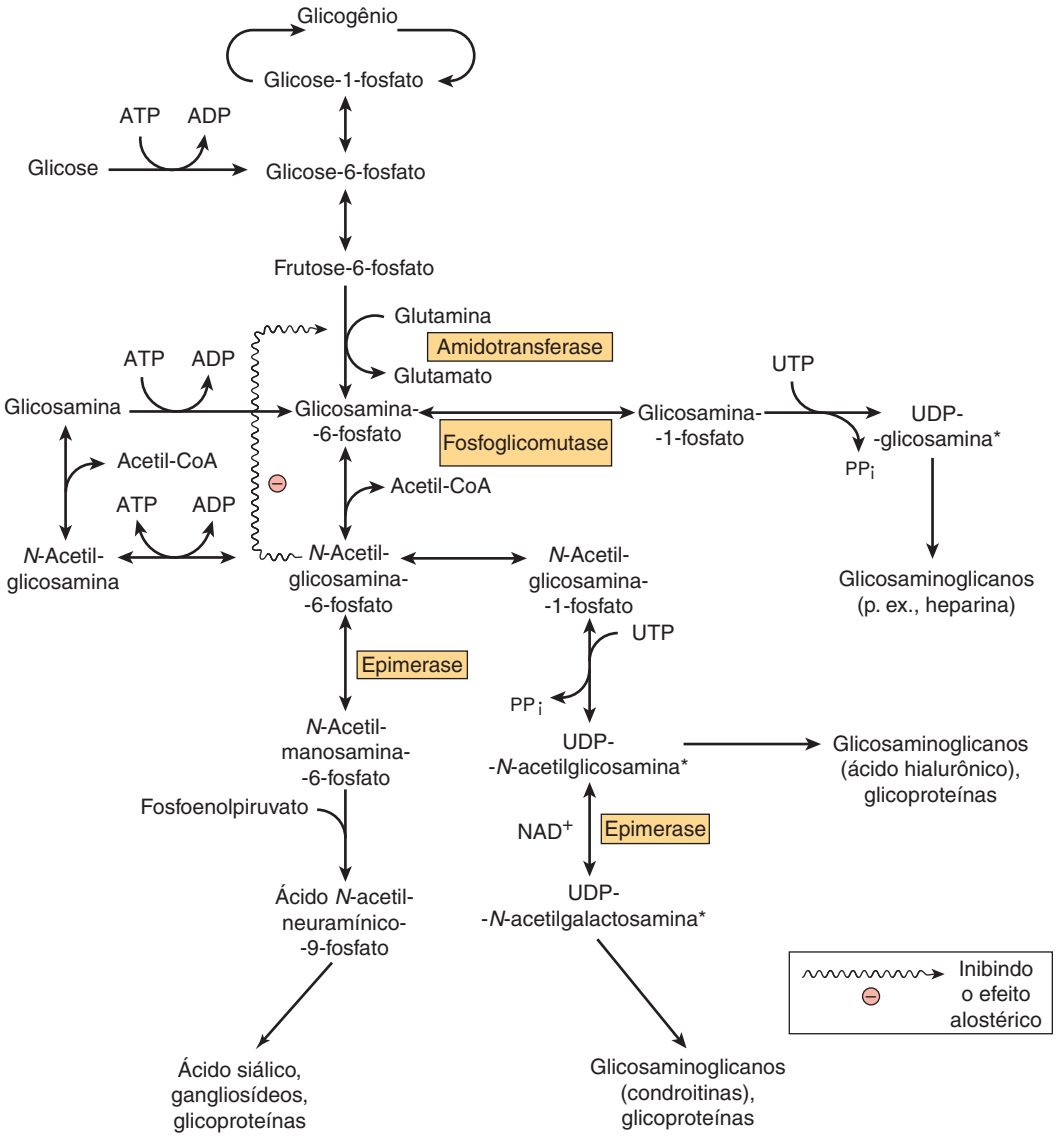


FIGURA 21-7 Resumo das inter-relações no metabolismo dos aminoaçúcares. (*Análogo à UDPGlc.) De forma semelhante, outros nucleotídeos de purina ou de pirimidina podem ligar-se a açúcares ou aminoaçúcares. São exemplos a timidina difosfato (TDP)-glicosamina e a TDP-*N*-acetilglicosamina.

síntese de purinas *de novo* pelo ATP, e observa-se um aumento na formação de ácido úrico, causando hiperuricemia, que constitui a causa da gota (Capítulo 33). Como a frutose é absorvida pelo intestino delgado por difusão mediada por transportador (passiva), o uso de doses orais altas pode resultar em diarreia osmótica.

Defeitos no metabolismo da frutose causam doença

A ausência de frutoquinase hepática provoca **frutosúria essencial**, uma condição benigna e assintomática. A ausência de aldolase B, que cliva a frutose-1-fosfato, resulta em **intolerância hereditária à frutose**, que se caracteriza por hipoglicemia profunda e vômitos após o consumo de frutose (ou de sacarose, que produz frutose durante a digestão) (Figura 21-5). As dietas com baixo teor de frutose, sorbitol e sacarose são benéficas para ambas as condições. Uma consequência da intolerância hereditária à frutose e de uma condição relacionada, resultante da **deficiência de frutose-1,6-bifosfatase**, é a **hipoglicemia** induzida por frutose, a despeito da presença de grandes reservas de glicogênio, visto que a frutose-1-fosfato e 1,6-bifosfato inibem alostericamente a glicogênio fosforilase hepática. O sequestro de fosfato inorgânico também leva à depleção de ATP e ao desenvolvimento de hiperuricemia.

A frutose e o sorbitol na lente do olho estão associados à catarata diabética

No diabetes melito, tanto a frutose quanto o sorbitol são encontrados na lente do olho em concentrações aumentadas e podem estar envolvidos na patogenia da **catarata diabética**. A **via do sorbitol** (**poliol**) (ausente no fígado) é responsável pela formação de frutose a partir da glicose (ver Figura 21-5), e a sua atividade

aumenta à medida que a concentração de glicose aumenta nos tecidos que não são sensíveis à insulina, isto é, a lente, os nervos periféricos e os glomérulos renais. A glicose é reduzida a sorbitol pela **aldose redutase**, seguida de oxidação do sorbitol em frutose na presença de NAD^+ e sorbitol-desidrogenase (poliol-desidrogenase). O sorbitol não sofre difusão através das membranas celulares, porém acumula-se, causando lesão osmótica. Simultaneamente, os níveis de mioinositol diminuem. Em animais de laboratório, o acúmulo de sorbitol e a depleção de mioinositol, bem como a formação de cataratas diabéticas, podem ser evitados por inibidores da aldose-redutase. Um desses inibidores foi aprovado no Japão para o tratamento da neuropatia diabética, embora haja pouca ou nenhuma evidência de que os inibidores possam ser efetivos na prevenção de cataratas ou na redução da progressão da neuropatia diabética nos seres humanos.

As deficiências enzimáticas na via da galactose causam galactosemia

Ocorre incapacidade de metabolizar a galactose nas **galactosemias**, que podem ser causadas por defeitos hereditários da galactoquinase, uridil transferase ou 4-epimerase (Figura 21-6A), embora a deficiência de **uridil transferase** seja a mais bem conhecida. A galactose é um substrato da aldose redutase, com formação de galactitol, que se acumula na lente do olho, causando catarata. A condição é mais grave se for o resultado de um defeito da uridil transferase, visto que há acúmulo de galactose-1-fosfato, que causa depleção do fosfato inorgânico no fígado. Por fim, ocorrem insuficiência hepática e deterioração mental. Na deficiência de uridil-transferase, a epimerase é encontrada em quantidades adequadas, de modo que o indivíduo com galactosemia ainda consegue formar UDPGal a partir da glicose. Isso explica como é possível que as crianças acometidas tenham crescimento e desenvolvimento normais, apesar da dieta desprovida de galactose usada para controlar os sintomas da doença.

RESUMO

- A via das pentoses-fosfato, que ocorre no citosol, pode responder pela oxidação completa da glicose, produzindo NADPH e CO_2, mas não ATP.
- A via possui uma fase oxidativa, que é irreversível e que gera NADPH, e uma fase não oxidativa, que é reversível e fornece precursores de ribose para a síntese de nucleotídeos. A via completa é encontrada principalmente nos tecidos que têm necessidade de NADPH para processos de síntese redutora, como, por exemplo, a lipogênese ou a esteroidogênese, enquanto a fase não oxidativa ocorre em todas as células que necessitam de ribose.
- Nos eritrócitos, a via desempenha uma importante função na prevenção da hemólise, fornecendo NADPH para manter a glutationa no estado reduzido como substrato da glutationa-peroxidase.
- A via do ácido urônico constitui a fonte de ácido glicurônico para a conjugação de numerosas substâncias endógenas e exógenas antes de sua excreção na forma de glicuronídeos na urina e na bile.
- A frutose escapa da principal etapa reguladora na glicólise, catalisada pela fosfofrutoquinase, e estimula a síntese de ácidos graxos e a secreção hepática de triacilgliceróis.
- A galactose é sintetizada a partir da glicose na glândula mamária em lactação e em outros tecidos nos quais é necessária para a síntese de glicolipídeos, proteoglicanos e glicoproteínas.

REFERÊNCIAS

Ali M, Rellos P, Cox TM: Hereditary fructose intolerance. J Med Gen 1998;35:353.
Cappellini MD, Fiorelli G: Glucose 6-phosphate dehydrogenase defi ciency. Lancet 2008;371:64.
Dunlop M: Aldose reductase and the role of the polyol pathway in diabetic nephropathy. Kidney Int 2000;77:S3.
Grant CM: Metabolic reconfi guration is a regulated response to oxidative stress. J Biol 2008;7:1.
Hers HG, Hue L: Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. Annu Rev Biochem 1983;52:617.
Horecker BL: Th e pentose phosphate pathway. J Biol Chem 2002;277:47965.
Le KA, Tappy L: Metabolic eff ects of fructose. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2006;9:469.
Leslie ND: Insights into the pathogenesis of galactosemia. Ann Rev Nutr 2003;23:59.
Manganelli G, Fico A, Martini G, et al: (2010). Discussion on pharmacogenetic interaction in G6PD defi ciency and methods to identify potential hemolytic drugs. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets 2010;10:143.
Mayes PA: Intermediary metabolism of fructose. Amer J Clin Nutr 1993;58:754.
Van den Berghe G: Inborn errors of fructose metabolism. Ann Rev Nutr 1994;14:41.
Veech RL: A humble hexose monophosphate pathway metabolite regulates short- and long-term control of lipogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:5578.
Wamelink MM, Struys EA, Jakobs C: (2008). Th e biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: a review. J Inherit Metab Dis 2008;31:703.
Wong D: Hereditary fructose intolerance. Mol Genet Metab 2005;85:165.

CAPÍTULO 22

Oxidação dos Ácidos Graxos: Cetogênese

Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e
Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever os processos pelos quais os ácidos graxos são transportados no sangue e ativados, assim como são transportados para a matriz das mitocôndrias para a sua degradação para a obtenção de energia.
- Delinear a via da β-oxidação pela qual os ácidos graxos são metabolizados em acetil-CoA, e explicar como esse processo leva à produção de grandes quantidades de ATP a partir dos equivalentes redutores produzidos durante a β-oxidação, e o metabolismo subsequente da acetil-CoA pelo ciclo do ácido cítrico.
- Identificar os três compostos denominados "corpos cetônicos" e descrever as reações pelas quais são formados nas mitocôndrias hepáticas.
- Reconhecer que os corpos cetônicos são combustíveis importantes para os tecidos extra-hepáticos e indicar as condições nas quais a sua síntese e utilização são favorecidas.
- Indicar os três estágios no metabolismo dos ácidos graxos onde a cetogênese é regulada.
- Compreender que a produção excessiva de corpos cetônicos leva ao desenvolvimento de cetose e, quando prolongada, de cetoacidose, e identificar as condições patológicas nas quais esse processo ocorre.
- Fornecer exemplos de doenças associadas ao comprometimento da oxidação dos ácidos graxos.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Embora os ácidos graxos sofram degradação por oxidação a acetil-CoA, e também sejam sintetizados a partir da acetil-CoA, a oxidação dos ácidos graxos não representa uma simples reversão de sua biossíntese, porém um processo inteiramente diferente, que ocorre em outro compartimento da célula. A separação entre a oxidação dos ácidos graxos, que ocorre nas mitocôndrias, e a sua biossíntese, que ocorre no citosol, permite que cada um desses dois processos seja individualmente controlado e integrado de acordo com as necessidades teciduais. Cada etapa na oxidação dos ácidos graxos envolve derivados da acil-CoA, é catalisada por enzimas distintas, utiliza NAD^+ e FAD como coenzimas e gera ATP. Trata-se de um processo aeróbio, que exige a presença de oxigênio.

O aumento da oxidação dos ácidos graxos constitui uma característica do estado de inanição e do diabetes melito, levando à produção de **corpos cetônicos** pelo fígado (**cetose**). Os corpos cetônicos são ácidos e, quando produzidos em excesso por longos períodos de tempo, como ocorre no diabetes, causam **cetoacidose**, que acaba sendo fatal. Como a gliconeogênese depende da oxidação dos ácidos graxos, qualquer comprometimento na oxidação dos ácidos graxos leva à **hipoglicemia**. Isso ocorre em vários estados de **deficiência de carnitina** ou de deficiência de enzimas essenciais para a oxidação dos ácidos graxos, como, por exemplo, a **carnitina-palmito-iltransferase**, ou durante a inibição da oxidação dos ácidos graxos por venenos, como, por exemplo, **hipoglicina**.

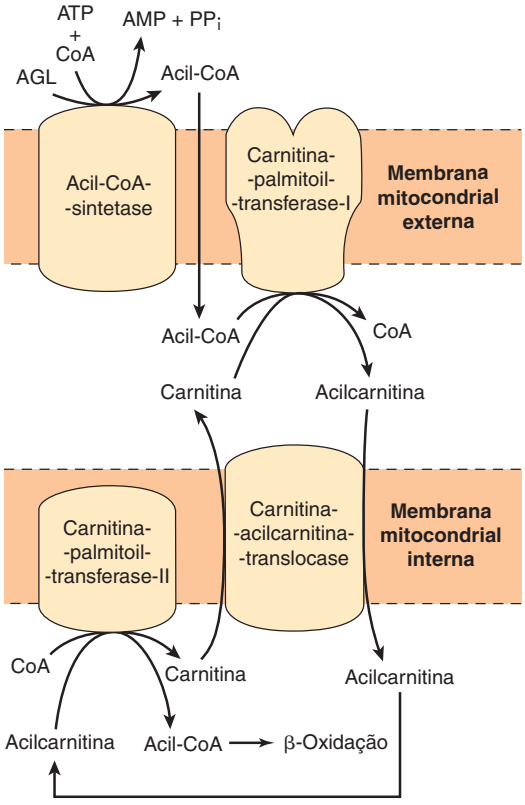


FIGURA 22-1 Papel da carnitina no transporte dos ácidos graxos de cadeia longa através da membrana mitocondrial interna. A acil-CoA de cadeia longa não pode atravessar a membrana mitocondrial interna, somente o seu produto metabólico, a acilcarnitina.

A OXIDAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS OCORRE NAS MITOCÔNDRIAS

Os ácidos graxos são transportados no sangue como ácidos graxos livres

Os ácidos graxos livres (AGL) – também denominados ácidos graxos não esterificados (AGNE) – são ácidos graxos que se encontram no **estado não esterificado**. No plasma, os AGL de cadeias mais longas estão associados à **albumina**, enquanto na célula estão ligados a uma **proteína de ligação de ácidos graxos**, de modo que, na verdade, nunca estão realmente "livres". Os ácidos graxos de cadeia mais curta são mais hidrossolúveis e ocorrem como ácidos não ionizados ou como ânions de ácido graxo.

Os ácidos graxos são ativados antes de seu catabolismo

Os ácidos graxos devem ser inicialmente convertidos em um intermediário ativo antes que possam ser catabolizados. Trata-se da única etapa em todo o processo de degradação de um ácido graxo que requer a energia proveniente do ATP. Na presença de ATP e da coenzima A, a enzima **acil-CoA-sintetase (tioquinase)** catalisa a conversão de um ácido graxo (ou AGL) em um "ácido graxo ativo", ou acil-CoA, que utiliza um fosfato de alta energia, com formação de AMP e PP_i (**Figura 22-1**). O PP_i é hidrolisado pela **pirofosfatase inorgânica,** com perda de mais um fosfato de alta energia, assegurando o progresso da reação global até o seu término. As acil-CoA-sintetases são encontradas no retículo endoplasmático, nos peroxissomos e tanto no interior quanto na membrana externa das mitocôndrias.

Os ácidos graxos de cadeia longa atravessam a membrana mitocondrial interna como derivados da carnitina

A **carnitina** (butirato de β-hidroxi-γ-trimetilamônio), $(CH_3)_3N^+—CH_2—CH(OH)—CH_2—COO^-$, possui ampla distribuição e é particularmente abundante no músculo. Acilas-CoA de cadeia longa (ou AGL) não podem atravessar a membrana interna das mitocôndrias. Entretanto, na presença de carnitina, a **carnitina-palmitoiltransferase-I**, localizada na membrana mitocondrial externa, converte a acil-CoA de cadeia longa em **acilcarnitina**, que é capaz de atravessar a membrana interna e ter acesso ao sistema de enzimas para β-oxidação (Figura 22-1). A **carnitina-acilcarnitina-translocase** atua como transportador de troca na membrana interna. A acilcarnitina é transportada para o interior, acoplada ao transporte de uma molécula de carnitina para o exterior e, em seguida, reage com CoA, em uma reação catalisada pela **carnitina-palmito-iltransferase-II**, localizada no interior da membrana interna, com nova formação de acil-CoA na matriz mitocondrial e liberação de carnitina.

A β-OXIDAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS ENVOLVE CLIVAGENS SUCESSIVAS, COM LIBERAÇÃO DE ACETIL-COA

Na **β-oxidação** (**Figura 22-2**), são clivados dois carbonos de cada vez da molécula de acil-CoA, começando na extremidade carboxílica. A cadeia é clivada entre os átomos de carbono α(2) e β(3)

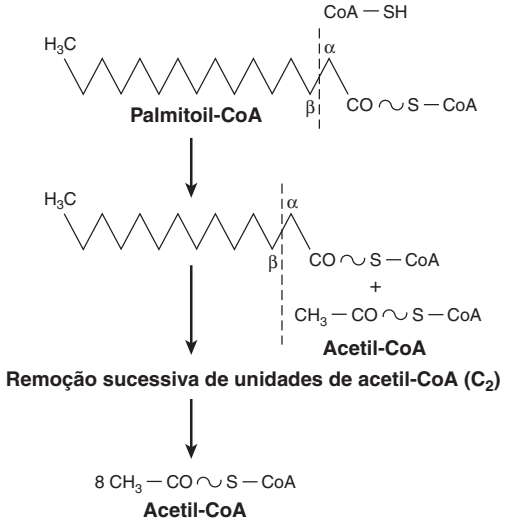


FIGURA 22-2 Visão geral da β-oxidação dos ácidos graxos.

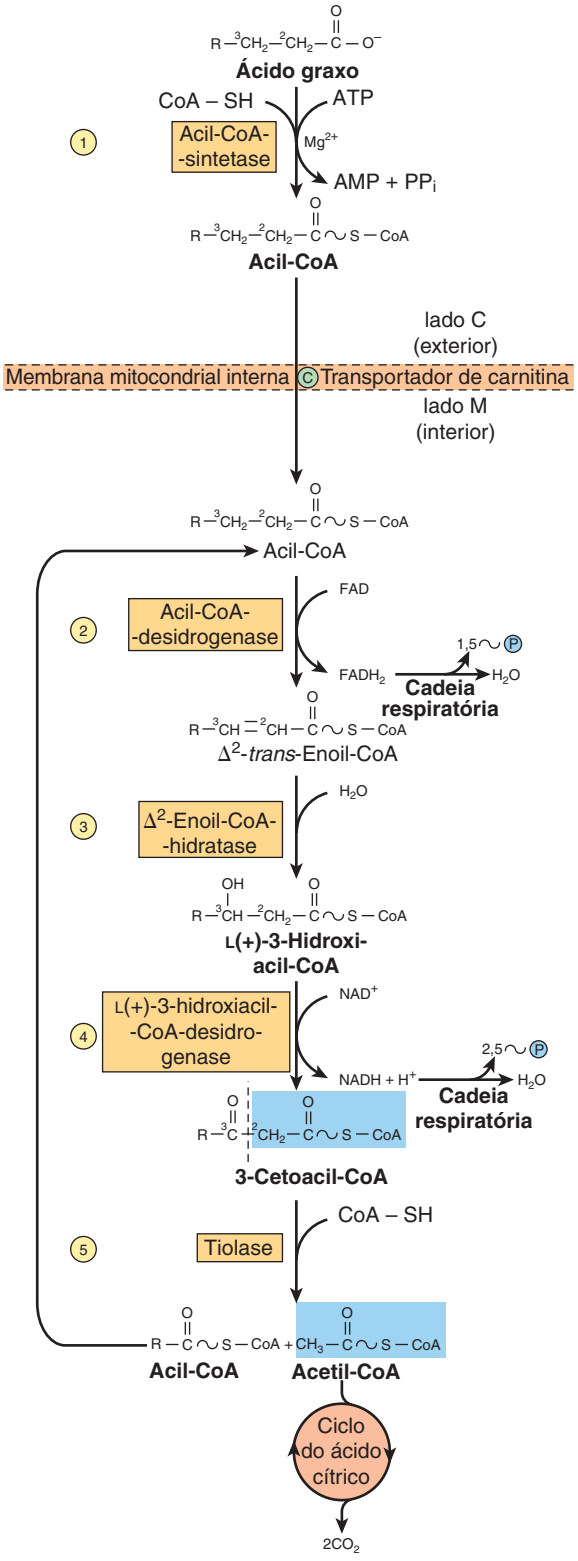


FIGURA 22-3 β-oxidação dos ácidos graxos. A acil-CoA de cadeia longa é processada pelas reações ② a ⑤, com remoção de acetil-CoA, em cada ciclo, pela tiolase (reação ⑤). Quando o radical acil tem um comprimento de apenas quatro átomos de carbono, são formadas duas moléculas de acetil-CoA na reação ⑤.

– por isso o nome de β-oxidação. As unidades de dois carbonos assim formadas são de acetil-CoA; por conseguinte, o palmitoil-CoA forma oito moléculas de acetil-CoA.

A sequência de reações cíclica gera $FADH_2$ e NADH

Várias enzimas, conhecidas coletivamente como "oxidase de ácidos graxos", são encontradas na matriz mitocondrial ou na membrana interna, adjacentes à cadeia respiratória. Essas enzimas catalisam a oxidação de acil-CoA em acetil-CoA, sendo o sistema acoplado à fosforilação do ADP a ATP (**Figura 22-3**).

A primeira etapa consiste na remoção de dois átomos de hidrogênio a partir dos átomos de carbono α(2) e β(3), em uma reação catalisada pela **acil-CoA-desidrogenase**, que requer a presença de FAD. Isso resulta na formação de Δ^2-*trans*-enoil-CoA e $FADH_2$. A reoxidação do $FADH_2$ pela cadeia respiratória requer a participação de outra flavoproteína, denominada **flavoproteína de transferência de elétrons** (Capítulo 12). A água é adicionada para saturar a dupla ligação e formar 3-hidroxiacil-CoA, em uma reação catalisada pela **Δ^2-enoil-CoA-hidratase**. O derivado 3-hidroxi sofre uma desidrogenação adicional no carbono 3, catalisada pela **L(+)-3-hidroxiacil-CoA-desidrogenase**, com formação do composto 3-cetoacil-CoA correspondente. Nesse caso, o NAD^+ é a coenzima envolvida. Por fim, a 3-cetoacil-CoA é clivada na posição 2,3 pela **tiolase** (3-cetoacil-CoA-tiolase), formando acetil-CoA e uma nova acil-CoA de dois carbonos mais curto do que a molécula original de acil-CoA. A acil-CoA formada na reação de clivagem entra novamente na via oxidativa, na reação 2 (Figura 22-3). Dessa maneira, um ácido graxo de cadeia longa pode ser totalmente degradado a acetil-CoA (unidades de C_2). Já que a acetil-CoA pode ser oxidada a CO_2 e água por meio do ciclo do ácido cítrico (que também é encontrado no interior das mitocôndrias), obtém-se a oxidação completa dos ácidos graxos.

A oxidação de um ácido graxo com número ímpar de átomos de carbono dá origem a acetil-CoA e a uma molécula de propionil-CoA

Os ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono são oxidados pela via da β-oxidação, produzindo acetil-CoA, até chegar a um resíduo de três carbonos (propionil-CoA). Esse composto é convertido em succinil-CoA, um constituinte do ciclo do ácido cítrico (Figura 20-2). Por conseguinte, **o resíduo propionil de um ácido graxo de cadeia ímpar constitui a única parte de um ácido graxo que é glicogênica**.

A oxidação dos ácidos graxos produz uma grande quantidade de ATP

O transporte de elétrons provenientes do FADH e NADH pela cadeia respiratória leva à síntese de quatro fosfatos de alta energia (Capítulo 13) para cada um dos sete ciclos necessários para a degradação do ácido graxo C16, o palmitato, em acetil-CoA ($7 \times 4 = 28$). Formam-se, no total, oito mols de acetil-CoA, e cada um dá origem a 10 mols de ATP no processo de oxidação no ciclo do ácido cítrico, resultando em $8 \times 10 = 80$ mols. Dois mols devem ser subtraídos para a ativação inicial do ácido graxo, resultando

em um ganho efetivo de 106 mols de ATP por mol de palmitato, ou 106 × 51,6* = 5.470 kJ. Isso representa 68% da energia livre obtida da combustão do ácido palmítico.

(a partir da etapa da desidrogenase ligada à flavoproteína), que é degradado pela catalase (Capítulo 12). Portanto, essa desidrogenação nos peroxissomos não está diretamente ligada à fosforilação e à geração de ATP. O sistema facilita a oxidação dos **ácidos graxos de cadeia muito longa** (p. ex., C_{20}, C_{22}). Essas enzimas são induzidas por dietas ricas em gorduras e, em algumas espécies, por fármacos hipolipidêmicos, como o clofibrato.

As enzimas presentes nos peroxissomos não atacam os ácidos graxos de cadeia mais curta; a sequência da β-oxidação termina no octanoil-CoA. Ambos os grupos octanoil e acetil são subsequentemente oxidados nas mitocôndrias. Outro papel da β-oxidação nos peroxissomos consiste em encurtar a cadeia lateral do colesterol durante a formação dos ácidos biliares (Capítulo 26). Os peroxissomos também participam da síntese dos éteres glicerolipídeos (Capítulo 24), colesterol e dolicol (Figura 26-2).

A OXIDAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS OCORRE POR UMA VIA MODIFICADA DE β-OXIDAÇÃO

Qualquer Δ^4-*cis*-acil-CoA remanescente, como no caso do ácido linoleico, ou que esteja entrando na via nesse ponto após conversão pela acil-CoA desidrogenase em Δ^2-*trans*-Δ^4-*cis*-dienoil-CoA, é então metabolizado, conforme indicado na Figura 22-4.

A CETOGÊNESE OCORRE QUANDO HÁ UMA ELEVADA TAXA DE OXIDAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS NO FÍGADO

Essas três substâncias são coletivamente conhecidas como (também de-

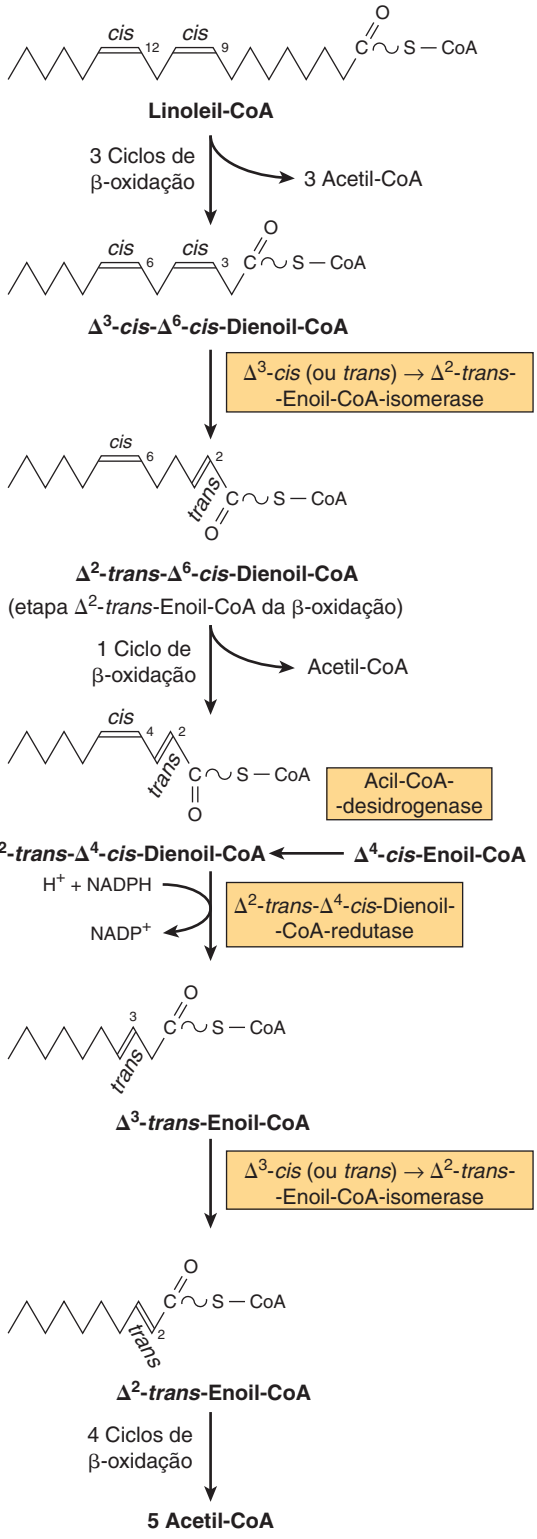


FIGURA 22-4 A sequência de reações na oxidação dos ácidos graxos insaturados, como, por exemplo, o ácido linoleico. Os ácidos graxos Δ^4-*cis*- ou ácidos graxos que formam Δ^4-*cis*-enoil-CoA entram na via na posição indicada na figura. O NADPH para a etapa da dienoil-CoA-redutase é fornecido por fontes intramitocondriais, como a glutamato desidrogenase, a isocitrato-desidrogenase e a NAD(P)H *trans*-hidrogenase.

* ΔG para a reação do ATP, conforme explicado no Capítulo 18.

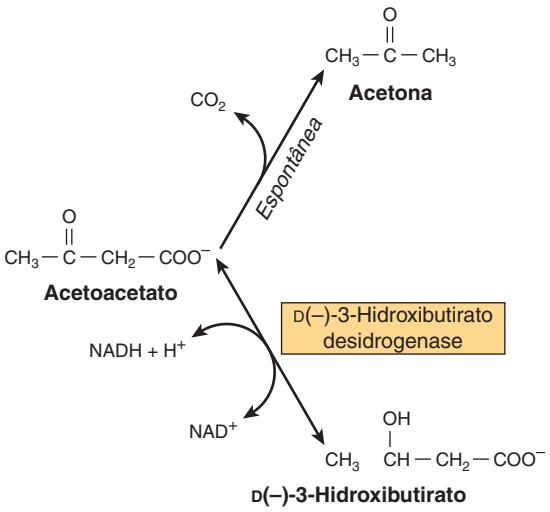


FIGURA 22-5 Inter-relações dos corpos cetônicos. A D(−)-3-hidroxibutirato desidrogenase é uma enzima mitocondrial.

nominados corpos de acetona ou [incorretamente*] "cetonas") (**Figura 22-5**). O acetoacetato e o 3-hidroxibutirato sofrem interconversão pela enzima mitocondrial, a **D(–)-3-hidroxibutirato-desidrogenase;** o equilíbrio é controlado pela razão [NAD^+]/[NADH] mitocondrial, isto é, pelo **estado redox**. A concentração total de corpos cetônicos no sangue de mamíferos bem alimentados normalmente não ultrapassa 0,2 mmol/L, exceto nos ruminantes, nos quais ocorre formação contínua de 3-hidroxibutirato a partir do ácido butírico (um produto da fermentação no rúmen) na parede do rúmen (**Figura 22-6**).

As enzimas responsáveis pela formação dos corpos cetônicos estão associadas, principalmente, às mitocôndrias. O acetoacetil-CoA, que constitui o material inicial para a cetogênese, também se origina diretamente dos quatro carbonos terminais de um ácido graxo durante a β-oxidação (**Figura 22-7**). A condensação do acetoacetil-CoA com outra molécula de acetil-CoA pela **3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-sintase** forma o 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA **(HMG-CoA).** Em seguida, a **3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-liase** atua na clivagem da acetil-CoA do HMG-CoA, deixando o acetoacetato livre. Os átomos de carbono retirados da molécula de acetil-CoA provêm da molécula original de acetoacetil-CoA. **Ambas as enzimas precisam estar presentes nas mitocôndrias para que ocorra a cetogênese**. Esse processo só ocorre no fígado e no epitélio do rúmen.

* O termo "cetonas" não deve ser empregado, visto que o 3-hidroxibutirato não é uma cetona, e existem cetonas no sangue que não são corpos cetônicos, como, por exemplo, o piruvato e a frutose.

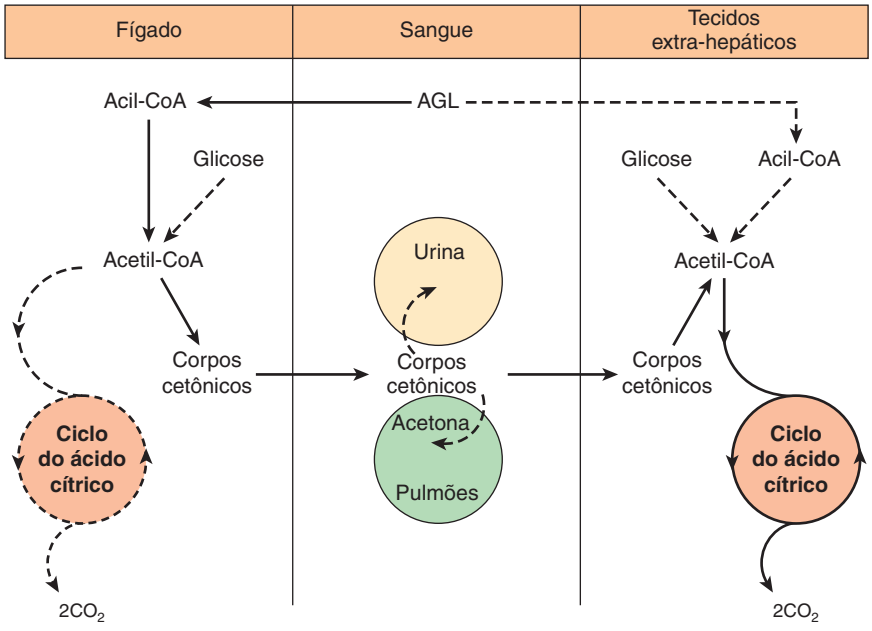


FIGURA 22-6 Formação, utilização e excreção dos corpos cetônicos. (A via principal está indicada por setas contínuas.)

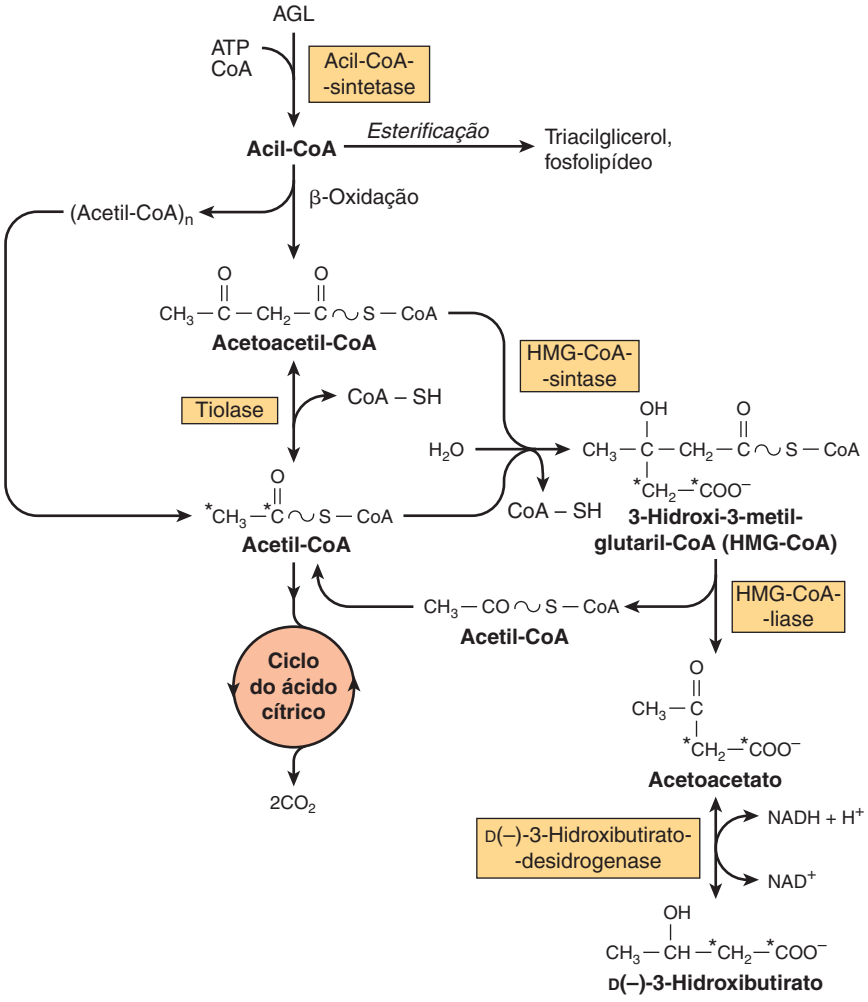


FIGURA 22-7 Vias da cetogênese no fígado. (AGL, ácidos graxos livres.)

Os corpos cetônicos servem de combustível para os tecidos extra-hepáticos

Nos tecidos extra-hepáticos, o acetoacetato é ativado para acetoacetil-CoA pela **succinil-CoA-acetoacetato-CoA-transferase**. A CoA é transferida do succinil-CoA para formar o acetoacetil-CoA (**Figura 22-8**). Com o acréscimo de uma CoA, o acetoacetil-CoA é clivado em duas acetil-CoA pela tiolase e oxidado no ciclo do ácido cítrico. Se houver elevação dos níveis sanguíneos, a oxidação dos corpos cetônicos aumenta até que, em uma concentração de ~12 mmol/L, o mecanismo de oxidação torna-se saturado. Quando isso ocorre, grande parte do consumo de oxigênio pode ser atribuída à oxidação dos corpos cetônicos.

Na maioria dos casos, a **cetonemia é causada pela produção aumentada de corpos cetônicos** pelo fígado, e não por uma deficiência de sua utilização pelos tecidos extra-hepáticos. Embora o acetoacetato e o D(−)-3-hidroxibutirato sejam prontamente oxidados pelos tecidos extra-hepáticos, a acetona é difícil de ser oxidada *in vivo* e, em grande parte, é volatilizada nos pulmões.

Na cetonemia moderada, a perda de corpos cetônicos pela urina corresponde apenas a um pequeno percentual da produção total e da utilização dos corpos cetônicos. Como existem efeitos semelhantes ao limiar renal (não há um verdadeiro limiar) que variam de acordo com as espécies e os indivíduos, a determinação da cetonemia, e não da cetonúria, constitui o método preferido para avaliar a gravidade da cetose.

A CETOGÊNESE É REGULADA EM TRÊS ETAPAS CRUCIAIS

1. A cetose não ocorre *in vivo,* a não ser que haja um aumento nos níveis de AGL circulantes provenientes da lipólise do triacilglicerol no tecido adiposo. **Os AGL são os precursores dos corpos cetônicos no fígado**. No estado alimentado e também em jejum, o fígado extrai ~30% dos AGL que pas-

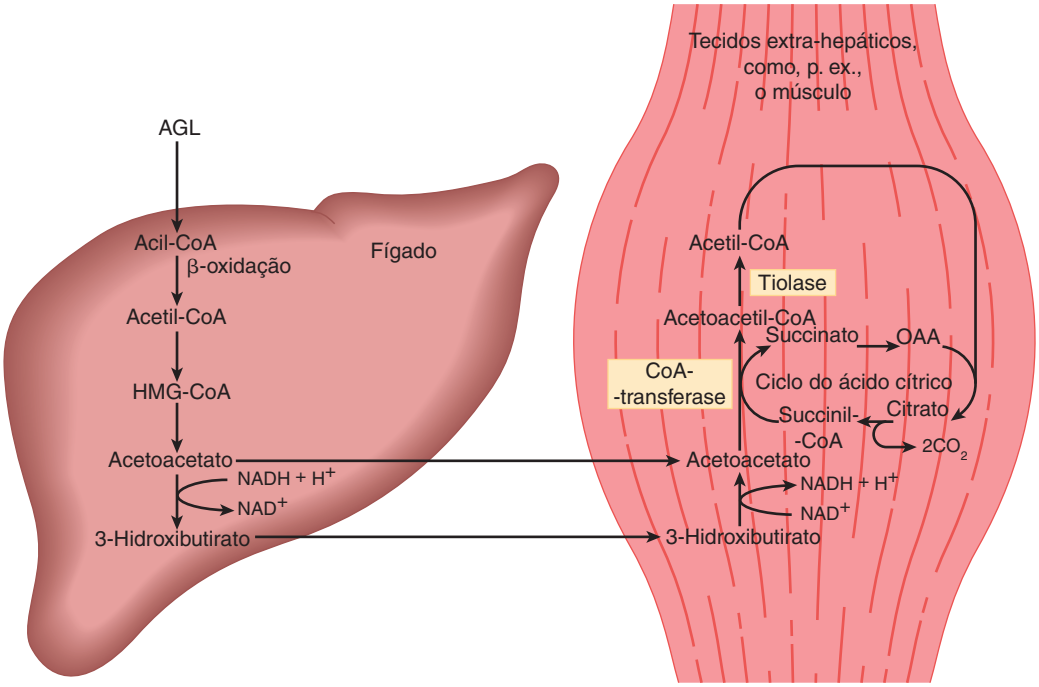


FIGURA 22-8 Transporte dos corpos cetônicos a partir do fígado e vias de utilização e oxidação nos tecidos extra-hepáticos.

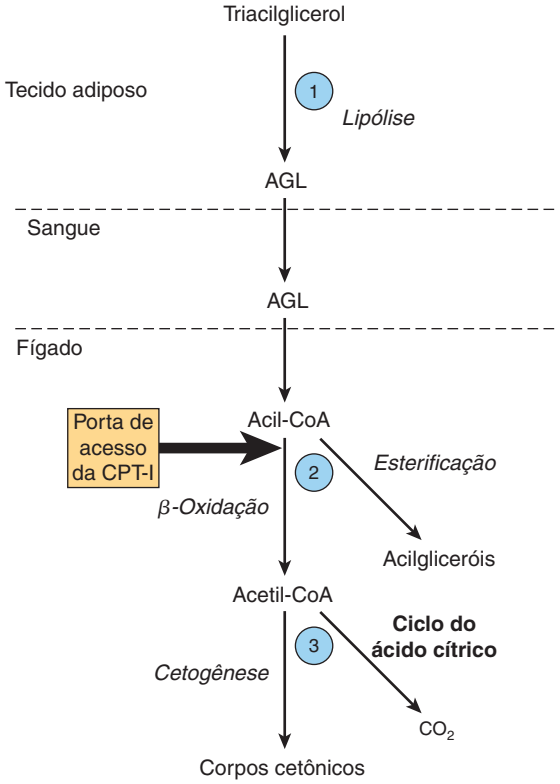


FIGURA 22-9 Regulação da cetogênese. ① a ③ mostram os três passos cruciais na via do metabolismo dos ácidos graxos livres (AGL) que determinam a magnitude da cetogênese. (CPT-I, carnitina-palmitoil-transferase-I.)

sam por ele, de modo que, em altas concentrações, o fluxo que passa pelo fígado é substancial. **Então, os fatores que regulam a mobilização dos AGL do tecido adiposo são importantes no controle da cetogênese** (**Figuras 22-9** e 25-8).

2. . A entrada dos ácidos graxos na via oxidativa é regulada pela **carnitina-palmitoil-transferase-I** (CPT--I), e o restante dos ácidos graxos captados é esterificado. A atividade da CPT-I é baixa no estado alimentado, levando à diminuição da oxidação dos ácidos graxos, enquanto apresenta-se alta no jejum prolongado, permitindo um aumento na oxidação dos ácidos graxos. (**Figura 22-10**). Nessas condições, os AGL entram no hepatócito em baixas concentrações e (VLDL). Entretanto, à medida que a concentração de AGL aumenta no jejum prolongado, a acetil-CoA-carboxilase é inibida diretamente pela acil-CoA, e o malonil-CoA diminui, interrompendo a inibição da CPT-I e possibilitando a β-oxidação de mais acil-CoA. Por conseguinte, a β-oxidação dos AGL é controlada pela CPT-I, o portal para a entrada no interior das mitocôndrias, com esterificação da parte dos AGL captados e não oxidados.
3. Por sua vez, a acetil-CoA formado durante a β-oxidação é oxidado no ciclo do ácido cítrico ou entra na via da cetogê-

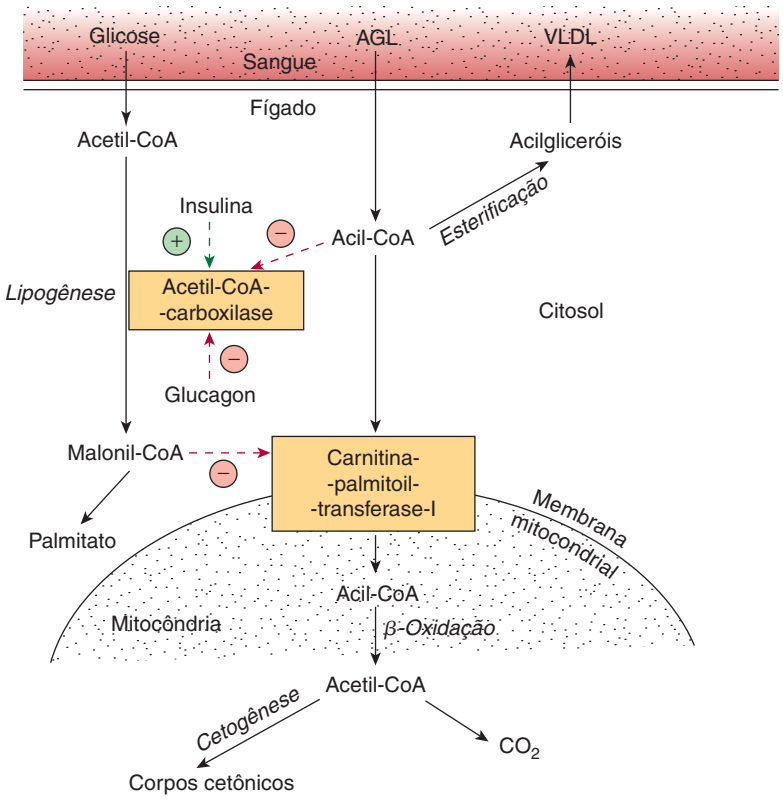


FIGURA 22-10 Regulação da oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa no fígado. (AGL, ácidos graxos livres; VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa.) Os efeitos reguladores positivos ⊕ e negativos ⊖ estão representados por setas pontilhadas, e o fluxo de substratos, por setas contínuas.

nese para formar corpos cetônicos.

Essa situação pode ser reconhecida quando se pensa que a oxidação completa de 1 mol de palmitato envolve uma produção efetiva de 106 mols de ATP por meio da β-oxidação e produção de CO_2 no ciclo do ácido cítrico (ver anteriormente), enquanto são produzidos apenas 26 mols de ATP quando o acetoacetato é o produto final, e apenas 21 mols quando o produto final é o 3-hidroxibutirato. Dessa forma, a cetogênese pode ser considerada como um mecanismo que permite ao fígado oxidar quantidades crescentes de ácidos graxos dentro das limitações de um sistema rigidamente acoplado da fosforilação oxidativa.

Essa queda pode ocorrer devido a uma elevação da razão $(NADH)/(NAD^+)$ causada pelo aumento da β-oxidação dos ácidos graxos, o que afeta o equilíbrio entre o oxalacetato e o malato, levando a uma redução na concentração de oxalacetato, bem como quando a gliconeogênese está elevada, o que ocorre quando os níveis de glicemia estão baixos. A ativação da piruvato-carboxilase, que catalisa a conversão do piruvato em oxalacetato pela acetil-CoA, alivia parcialmente esse problema; todavia, em condições como a inanição e o diabetes melito não tratado, ocorre produção excessiva de corpos cetônicos, causando cetose.

ASPECTOS CLÍNICOS

O comprometimento da oxidação dos ácidos graxos dá origem a doenças que frequentemente estão associadas à hipoglicemia

Pode ocorrer **deficiência de carnitina**, particularmente no recém-nascido – e, em particular, em lactentes prematuros –, devido à biossíntese inadequada ou à perda renal. Além disso, podem ocorrer perdas durante hemodiálise. Isso sugere uma necessidade dietética de carnitina em alguns indivíduos, semelhante à necessidade de vitamina. Os sintomas de deficiência incluem hipoglicemia, que constitui uma consequência do comprometimento da oxidação dos ácidos graxos, e acúmulo de lipídeos com fraqueza muscular. O tratamento consiste em suplementação oral de carnitina.

A **deficiência** hereditária de **CPT-I** afeta apenas o fígado, resultando em diminuição da oxidação dos ácidos graxos e cetogênese, com hipoglicemia. A **deficiência de CPT-II** afeta principalmente o músculo esquelético e, quando severa, o fígado. As sulfonilureias (**gliburida [glibenclamida]** e **tolbutamida**), usadas no tratamento do diabetes melito do tipo 2, reduzem a oxidação dos ácidos graxos e, portanto, a hiperglicemia ao inibir a CPT-I.

Os defeitos hereditários das enzimas da β-oxidação e da cetogênese também levam à hipoglicemia não cetótica, ao coma e à esteatose hepática. Sabe-se da existência de defeitos na 3-hidroxiacil-CoA-desidrogenase de cadeias longas e curtas (a deficiência da enzima para cadeias longas pode constituir uma causa da **esteatose hepática aguda da gravidez**). As **deficiências de 3-cetoacil-CoA-tiolase** e de **HMG-CoA-liase** também afetam a degradação da leucina, um aminoácido cetogênico (Capítulo 29).

A **doença do vômito da Jamaica** é causada pelo consumo de frutos imaturos da árvore *akee* (castanha da Jamaica), que contêm a toxina **hipoglicina**. Essa toxina inativa a acil-CoA-desidrogenase de cadeias médias e curtas, inibindo a β-oxidação e causando hipoglicemia. A **acidúria-dicarboxílica** caracteriza-se pela excreção de ácidos ω-dicarboxílicos C_6 a C_{10} e por hipoglicemia não cetótica, sendo causada pela ausência de **acil-CoA-desidrogenase de cadeia média** nas mitocôndrias. A **doença de Refsum** é um distúrbio neurológico raro, devido a um defeito metabólico que leva ao acúmulo de ácido fitânico, encontrado em laticínios, bem como na gordura e na carne dos ruminantes. Acredita-se que o ácido fitânico tenha efeitos patológicos sobre a função das membranas, a prenilação das proteínas e a expressão gênica. A **síndrome de Zellweger (cérebro-hepatorrenal)** ocorre em indivíduos com ausência hereditária rara de peroxissomos em todos os tecidos. Esses indivíduos acumulam ácidos polienoicos C_{26} a C_{38} no tecido cerebral e também exibem uma perda generalizada das funções peroxissomais. A doença causa graves sintomas neurológicos, e a maioria dos pacientes morre no primeiro ano de vida.

A cetose prolongada resulta em cetoacidose

Quantidades de corpos cetônicos acima do normal no sangue e na urina constituem a **cetonemia** (hipercetonemia) e **cetonúria**, respectivamente. A condição global é denominada **cetose**. A forma básica da cetose ocorre na **inanição** e envolve a depleção dos carboidratos disponíveis, juntamente com a mobilização dos AGL. Esse padrão geral de metabolismo é exagerado, produzindo os estados patológicos observados no **diabetes melito**, **e o diabetes tipo II é cada vez mais comum nos países ocidentais**; na **doença dos cordeiros gêmeos**; e na **cetose do gado leiteiro**. Formas não patológicas de cetose são encontradas na alimentação com alto teor de gorduras e após exercício físico intenso no estado pós-absortivo.

Tanto o ácido acetoacético quanto o ácido 3-hidroxibutírico [redacted]s. Todavia, a sua excreção contínua em grandes quantidades provoca depleção progressiva da reserva alcalina, causando **cetoacidose**. Isso pode ser fatal no **diabetes melito** não controlado.

RESUMO

- A oxidação dos ácidos graxos nas mitocôndrias leva à produção de grandes quantidades de ATP por um processo denominado β-oxidação, que cliva sequencialmente unidades de acetil-CoA a partir das cadeias de ácidos graxos. A acetil-CoA é oxidada no ciclo do ácido cítrico, gerando uma maior quantidade de ATP.
- Os corpos cetônicos (acetoacetato, 3-hidroxibutirato e acetona) são formados nas mitocôndrias hepáticas quando existe uma alta taxa de oxidação dos ácidos graxos. A via da cetogênese envolve a síntese e a degradação de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) por duas enzimas essenciais: a HMG-CoA sintase e a HMG-CoA liase.
- Os corpos cetônicos são combustíveis importantes nos tecidos extra-hepáticos.
- A cetogênese é regulada em três etapas cruciais: (1) o controle da mobilização de AGL a partir do tecido adiposo; (2) a atividade da carnitina-palmitoil-transferase-I no fígado, que determina a proporção do fluxo de ácidos graxos que é oxidada, em lugar de esterificada; e (3) a distribuição de acetil-CoA entre a via da cetogênese e o ciclo do ácido cítrico.
- As doenças associadas ao comprometimento da oxidação dos ácidos graxos resultam em hipoglicemia, infiltração gordurosa dos órgãos e hipocetonemia.
- A cetose é leve no jejum prolongado, porém severa no diabetes melito e na cetose dos ruminantes.

REFERÊNCIAS

Eaton S, Bartlett K, Pourfarzam M: Mammalian mitochondrial β-oxidation. Biochem J 1996;320:345.

Fukao T, Lopaschuk GD, Mitchell GA: Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid metabolism. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2004;70:243.

Gurr MI, Harwood JL, Frayn K: Lipid Biochemistry. Blackwell Publishing, 2002.

Reddy JK, Mannaerts GP: Peroxisomal lipid metabolism. Annu Rev Nutr 1994;14:343.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill, 2001.

Wood PA: Defects in mitochondrial beta-oxidation of fatty acids. Curr Opin Lipidol 1999;10:107.

Biossíntese dos Ácidos Graxos e Eicosanoides

23

Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e
Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever a reação catalisada pela acetil-CoA-carboxilase e compreender os mecanismos pelos quais a sua atividade é regulada para controlar a taxa de síntese de ácidos graxos.
- Esboçar a estrutura do complexo multienzimático da sintase de ácido graxo, indicando a sequência das enzimas nas duas cadeias peptídicas do homodímero.
- Explicar como os ácidos graxos de cadeia longa são sintetizados pela condensação repetida de unidades de dois carbonos, com formação preferencial do palmitato de 16 carbonos na maioria dos tecidos, e identificar os cofatores necessários.
- Indicar as fontes de equivalentes redutores (NADPH) para a síntese de ácidos graxos.
- Compreender como a síntese de ácidos graxos é regulada pelo estado nutricional e identificar outros mecanismos de controle que operam além da modulação da atividade da acetil-CoA-carboxilase.
- Identificar os ácidos graxos nutricionalmente essenciais e explicar por que eles não podem ser sintetizados no organismo.
- Explicar como os ácidos graxos poli-insaturados são sintetizados pelas enzimas dessaturase e de alongamento.
- Delinear as vias da ciclo-oxigenase e lipoxigenase responsáveis pela formação das várias classes de eicosanoides.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

e, ao passo que, nos ruminantes, é o acetato que desempenha esse papel e representa o principal combustível produzido pela dieta. Não foram relatadas doenças críticas dessa via nos seres humanos. Entretanto, ocorre inibição da lipogênese no **diabetes melito** tipo 1 (dependente de insulina), e a ocorrência de variações na atividade do processo afeta a natureza e a extensão da **obesidade**.

Os ácidos graxos insaturados presentes nos fosfolipídeos da membrana celular são importantes na manutenção da fluidez da membrana. Os tecidos animais têm uma capacidade limitada de dessaturar os ácidos graxos e necessitam na dieta de certos ácidos graxos poli-insaturados de origem vegetal. As prostaglandinas medeiam a **inflamação** e a **dor**, induzem o **sono** e também regulam a **coagulação sanguínea** e a **reprodução**. Os **anti-inflamatórios não esteroides (AINEs),** como o **ácido acetilsalicílico e o ibuprofeno**, atuam ao inibir a síntese de prostaglandinas. Os leucotrienos apresentam propriedades relacionadas com a contração muscular e a quimiotaxia e são importantes nas reações alérgicas e na inflamação.

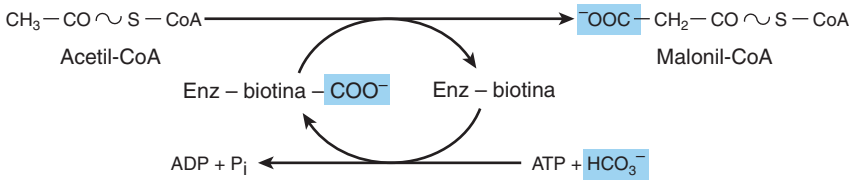


FIGURA 23-1 Biossíntese de malonil-CoA. (Enz, acetil-CoA-carboxilase.)

A PRINCIPAL VIA DE SÍNTESE *DE NOVO* DOS ÁCIDOS GRAXOS (LIPOGÊNESE) OCORRE NO CITOSOL

Esse sistema é encontrado em muitos tecidos, incluindo o fígado, os rins, o cérebro, os pulmões, as glândulas mamárias e o tecido adiposo.

. A acetil-CoA-carboxilase exige a presença da vitamina B **biotina** (**Figura 23-1**).

r. A reação ocorre em duas etapas: (1) en-volvendo ATP e (2) a transferência do grupo carboxila ao acetil-CoA para formar malonil-CoA.

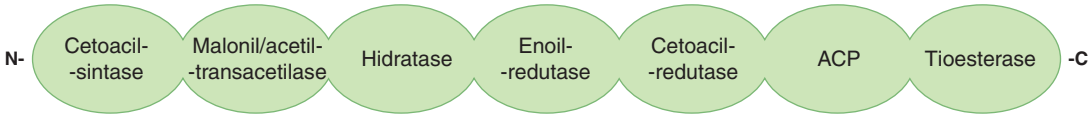
O complexo de sintase de ácido graxo é um homodímero de duas cadeias polipeptídicas contendo seis atividades enzimáticas

Nos mamíferos, as enzimas individuais do sistema da ácido graxo sintase estão ligadas em um complexo polipeptídico multienzimático, que incorpora a

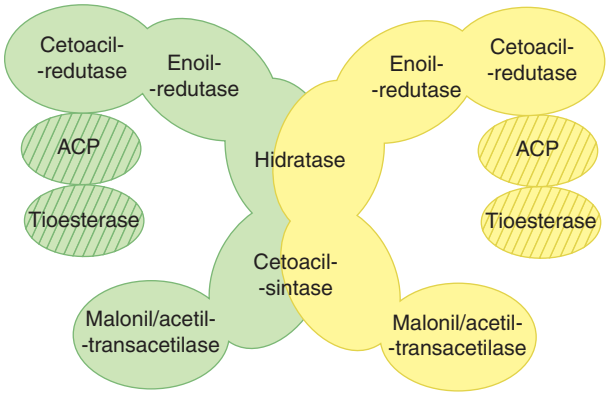
a qual assume o papel de CoA e contém a vitamina

na forma de 4′-fosfopanteteína (Figura 44-18). Na estrutura primária da proteína, os domínios enzimáticos estão ligados na sequência ilustrada na **Figura 23-2**. Entretanto, a cristalografia por raios X da estrutura tridimensional demonstrou que o complexo

A posição da ACP e dos domínios de tioesterase ainda não pode ser resolvida pela cristalografia por raios X, possivelmente por serem demasiado flexíveis; todavia, acredita-se que esses domínios estejam localizados próximo à enzima 3-cetoacil-redutase. O uso de uma unidade funcional mul-



Sequência dos domínios enzimáticos na estrutura primária do monômero da sintase de ácido graxo



Homodímero da ácido graxo sintase

FIGURA 23-2 Complexo multienzimático da sintase de ácido graxo. O complexo é um dímero constituído de dois monômeros polipeptídicos idênticos, em que seis enzimas e a proteína transportadora de acila (ACP) estão ligadas na estrutura primária da sequência ilustrada. A cristalografia por raios X da estrutura tridimensional demonstrou que os dois monômeros no complexo estão dispostos em forma de X. A posição da ACP e da tioesterase ainda não está estabelecida, porém acredita-se que esteja próxima ao domínio enzimático da 3-cetoacil-redutase.

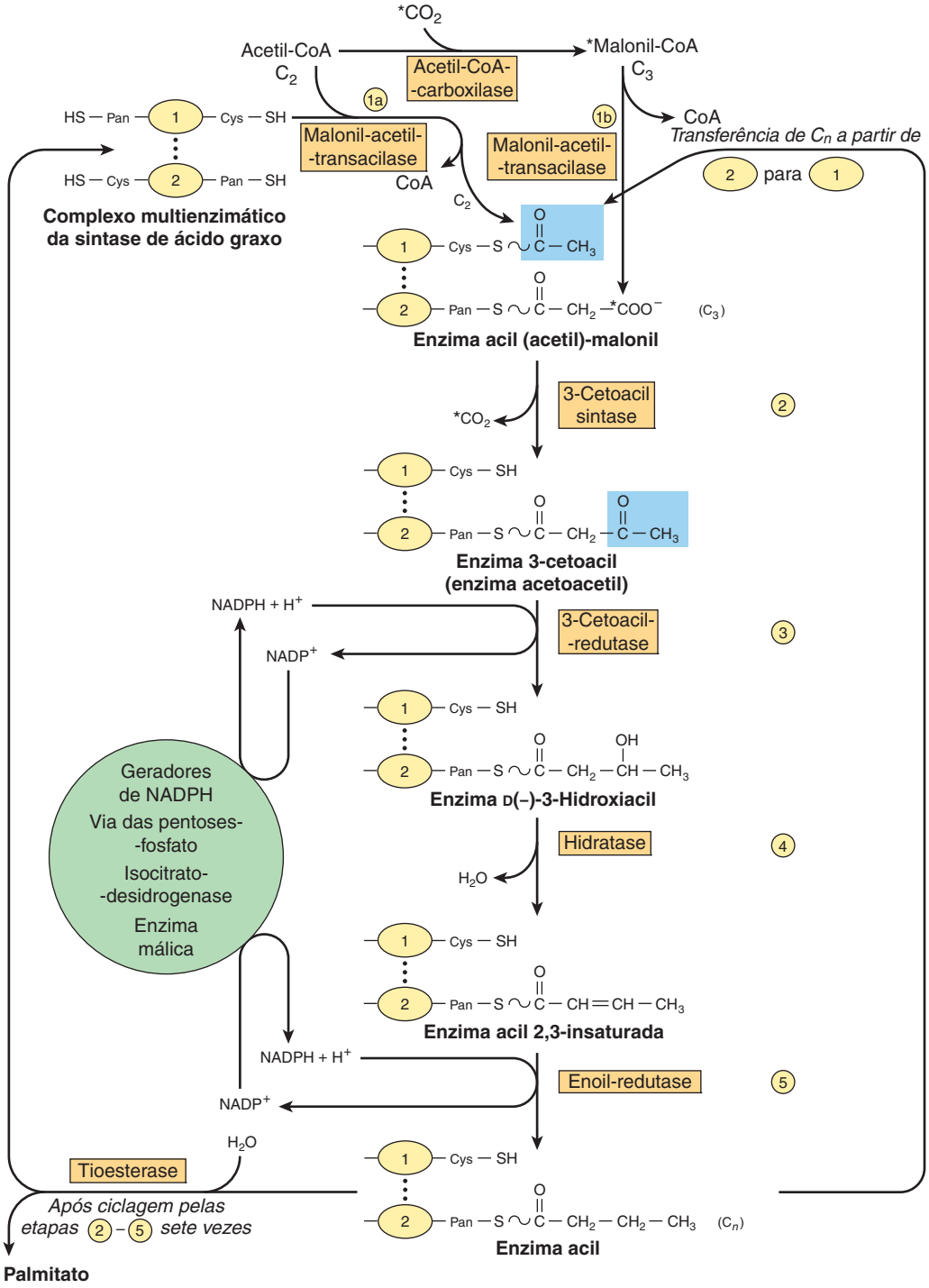


FIGURA 23-3 Biossíntese dos ácidos graxos de cadeia longa. Detalhes de como a adição de um resíduo de malonil produz o crescimento da cadeia acil em dois átomos de carbono. (Cys, resíduo de cisteína; Pan, 4′-fosfopanteteína.) Os blocos realçados com azul contêm inicialmente uma unidade C_2 derivada da acetil-CoA (conforme ilustrado) e, subsequentemente, a unidade C_n formada na reação 5.

tienzimática tem as vantagens de obter o efeito de compartimentalização do processo dentro da célula, sem a criação de barreiras de permeabilidade, e coordenar a síntese de todas as enzimas no complexo, visto que ele é codificado por um único gene.

A princípio, uma molécula iniciadora de acetil-CoA combina-se com um grupo –SH de uma cisteína **(Figura 23-3**, reação 1a), enquanto a malonil-CoA combina-se com o grupo –SH adjacente presente na 4′-fosfopanteteína da ACP do outro monômero (reação 1b). Essas reações são catalisadas pela **malonil-**-acetil-**transacilase**, para formar a **enzima acetil(acil)-malonil**. O grupo acetil ataca o grupo metileno do resíduo de malonil, em uma reação catalisada pela **3-cetoacil-sintase**, e libera CO_2, formando a enzima 3-cetoacil (enzima acetoacetil) (reação 2), liberando o grupo –SH da cisteína. A descarboxilação permite que a reação prossiga até o seu término, levando toda a sequência das reações na direção anterógrada. O grupo 3-cetoacetil é reduzido, desidratado e novamente reduzido (reações 3 a 5) para formar a acil-S-enzima correspondente saturada. Uma nova molécula de malonil-CoA combina-se com o –SH da 4′-fosfopanteteína, deslocando o resíduo acil saturado para o grupo –SH da cisteína livre. A sequência de reações é repetida por mais seis vezes até a montagem de um radical acil saturado de 16 carbonos (palmitoil). É liberado do complexo enzimático pela atividade da sexta enzima do complexo, a **tioesterase** (desacilase). O palmitato livre deve ser ativado a acil-CoA antes de prosseguir através de qualquer outra via metabólica. Seus possíveis destinos consistem em esterificação em acilglicerois, alongamento da cadeia ou dessaturação, ou esterificação a éster de colesteril. Na glândula mamária, existe uma tioesterase separada específica para os resíduos de acil de C_8, C_{10} ou C_{12}, os quais são encontrados subsequentemente nos lipídeos do leite.

A equação para a síntese global do palmitato a partir de acetil-CoA e malonil-CoA é a seguinte:

$$CH_3CO{-}S{-}CoA + 7HOOCCHCO{-}S{-}CoA + 14NADPH + 14H^+ \rightarrow CH_3(CH_2)_{14}COOH + 7CO_2 + 6H_2O + 8CoA{-}SH + 14NADP^+$$

A acetil-CoA usada como iniciador forma os átomos de carbono 15 e 16 do palmitato. A adição de todas as unidades subsequentes de C_2 ocorre por meio da malonil-CoA. O propionil-CoA atua como iniciador para a síntese de ácidos graxos de cadeia longa que apresentam um número ímpar de átomos de carbono, encontrados particularmente na gordura e no leite dos ruminantes.

A principal fonte de NADPH para a lipogênese é a via das pentoses-fosfato

O NADPH está envolvido como doador de equivalentes redutores na redução dos derivados, tanto do 3-cetoacil quanto do acil 2,3-insaturado (Figura 23-3, reações 3 e 5). As reações oxidativas da via das pentoses-fosfato (ver Capítulo 21) constituem a principal fonte do hidrogênio necessário para a síntese redutora dos ácidos graxos. De modo significativo, os tecidos especializados na lipogênese ativa – i.e., o fígado, o tecido adiposo e a glândula mamária em lactação – possuem uma via ativa das pentoses-fosfato. Além disso, ambas as vias metabólicas são encontradas no citosol da célula; dessa maneira, não existem membranas nem barreiras de permeabilidade contra a transferência do NADPH. Outras fontes de NADPH incluem a reação que converte o malato em piruvato, catalisada pela "**enzima málica**" (NADP-malato-desidrogenase) (**Figura 23-4**) e a reação extramitocondrial da **isocitrato desidrogenase** (que provavelmente não se qualifica como uma fonte substancial, exceto nos ruminantes).

A acetil-CoA constitui o principal bloco de construção dos ácidos graxos

A acetil-CoA é formada a partir da glicose pela oxidação do piruvato no interior das mitocôndrias. Entretanto, ele não se difunde prontamente no citosol extramitocondrial, o principal local de síntese dos ácidos graxos. O citrato, formado no interior das mitocôndrias após a condensação de acetil-CoA com oxalacetato no ciclo do ácido cítrico, é translocado para o compartimento extramitocondrial pelo transportador de tricarboxilato, onde, na presença de CoA e ATP, sofre clivagem em acetil-CoA e oxalacetato, em reação catalisada pela **ATP-citrato-liase**, cuja atividade aumenta no estado alimentado. A acetil-CoA torna-se então disponível para a formação de malonil-CoA e para síntese até palmitato (Figura 23-4). O oxalacetato resultante pode formar malato por meio da malato-desidrogenase ligada ao NADH, seguido de geração de NADPH pela enzima málica. O NADPH torna-se disponível para a lipogênese, e o piruvato pode ser usado para regenerar a acetil-CoA após transporte para a mitocôndria. Essa via representa um meio de transferir equivalentes redutores do NADH extramitocondrial para o NADP. De modo alternativo, o próprio malato pode ser transportado para a mitocôndria, onde tem a capacidade de formar novamente oxalacetato. Convém assinalar que o transportador de citrato (tribarboxilato) na membrana mitocondrial requer a presença de malato para troca com o citrato (ver Figura 13-10). Há pouca ATP-citrato-liase, ou enzima málica, nos ruminantes, provavelmente pelo fato de que, nessas espécies, o acetato (derivado da digestão dos carboidratos no rúmen e ativado em acetil-CoA no meio extramitocondrial) constitui a principal fonte de acetil-CoA.

O alongamento das cadeias de ácidos graxos ocorre no retículo endoplasmático

Essa via (**o** "**sistema microssomal**") alonga as acilas-CoA de ácidos graxos saturados e insaturados (a partir de C_{10}) em dois carbonos, utilizando a malonil-CoA como doadora de acetil e o NADPH como redutor, em uma reação catalisada pelo sistema microssomal de enzimas de alongamento de ácidos graxos (**Figura 23-5**). O alongamento do estearil-CoA no cérebro aumenta rapidamente durante a mielinização, a fim de fornecer ácidos graxos de C_{22} e C_{24} para os esfingolipídeos.

O ESTADO NUTRICIONAL REGULA A LIPOGÊNESE

O excesso de carboidratos é armazenado na forma de gordura em muitos animais para prevenção em períodos de deficiência

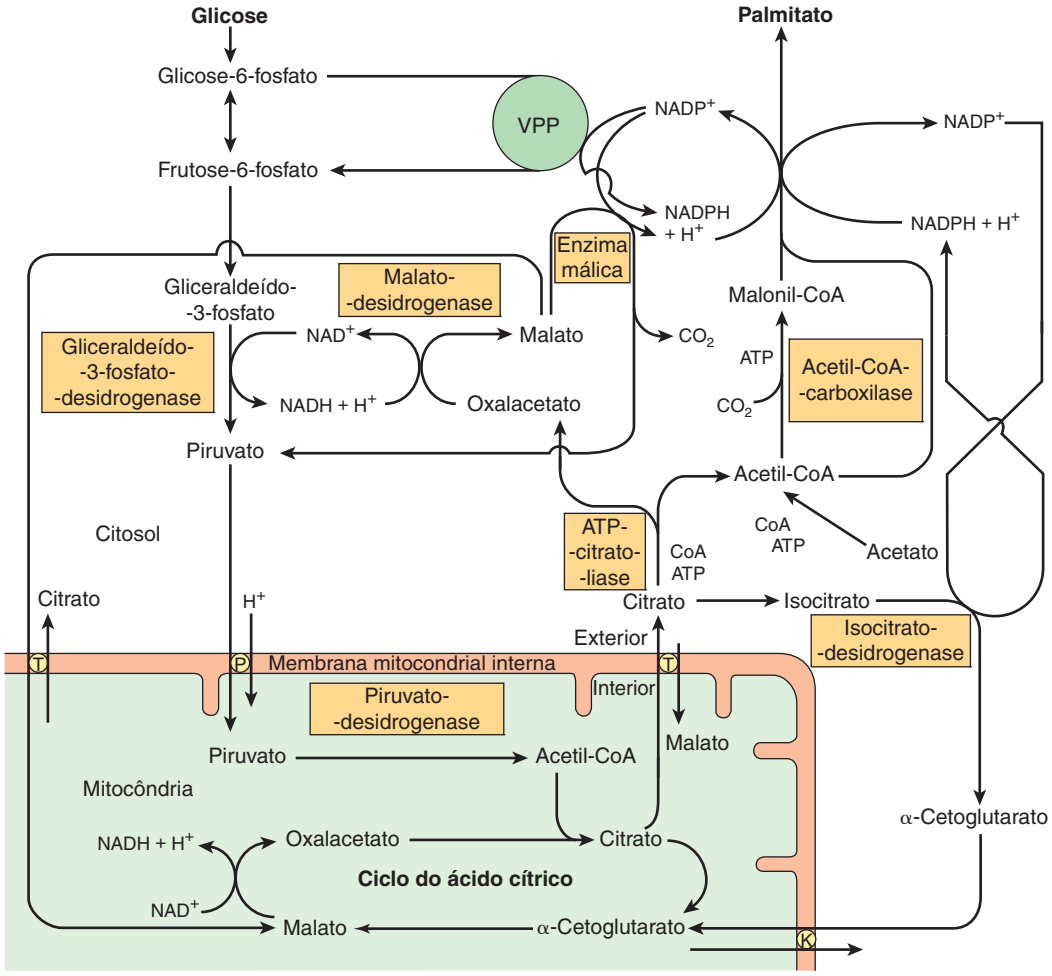


FIGURA 23-4 O suprimento de acetil-CoA e NADPH para a lipogênese. (K, transportador de α-cetoglutarato; P, transportador de piruvato; VPP, via das pentoses-fosfato; T, transportador de tricarboxilato.)

calórica, como jejum prolongado, hibernação, etc, bem como para fornecer a energia necessária entre as refeições nos animais, incluindo os seres humanos, que se alimentam a intervalos espaçados. A lipogênese converte a glicose e intermediários excedentes, como piruvato, lactato e acetil-CoA, em gordura, auxiliando na fase anabólica desse ciclo alimentar. O estado nutricional do organismo constitui o principal fator que regula a taxa de lipogênese. Por conseguinte, a taxa apresenta-se elevada no animal bem alimentado cuja dieta contém uma alta proporção de carboidratos. A taxa é reduzida nos estados de restrição de aporte calórico, dietas ricas em gordura ou deficiência de insulina, como a que ocorre no diabetes melito. Essas últimas condições estão associadas a concentrações elevadas de ácidos graxos livres no plasma, e foi demonstrada uma relação inversa entre a lipogênese hepática e a concentração sérica de ácidos graxos livres. Ocorre aumento da lipogênese quando há uma ingestão de sacarose, em lugar de glicose, visto que a frutose escapa do ponto de controle da fosfofrutoquinase na glicólise e segue para a via lipogênica (Figura 21-5).

A LIPOGÊNESE É REGULADA POR MECANISMOS DE CURTO E DE LONGO PRAZO

A síntese de ácidos graxos de cadeia longa é controlada, em curto prazo, pela modificação alostérica e covalente de enzimas e, em longo prazo, por alterações na expressão dos genes que governam a taxa de síntese das enzimas.

A acetil-CoA-carboxilase é a enzima mais importante na regulação da lipogênese

A acetil-CoA-carboxilase é uma enzima alostérica ativada pelo **citrato**, cuja concentração aumenta no estado de saciedade e constitui um indicador de suprimento abundante de acetil-CoA. O citrato promove a conversão da enzima de um dímero inativo em uma forma polimérica ativa, com massa molecular de vários milhões. A inativação é promovida pela fosforilação da enzima e por moléculas de acil-CoA de cadeia longa, fornecendo um

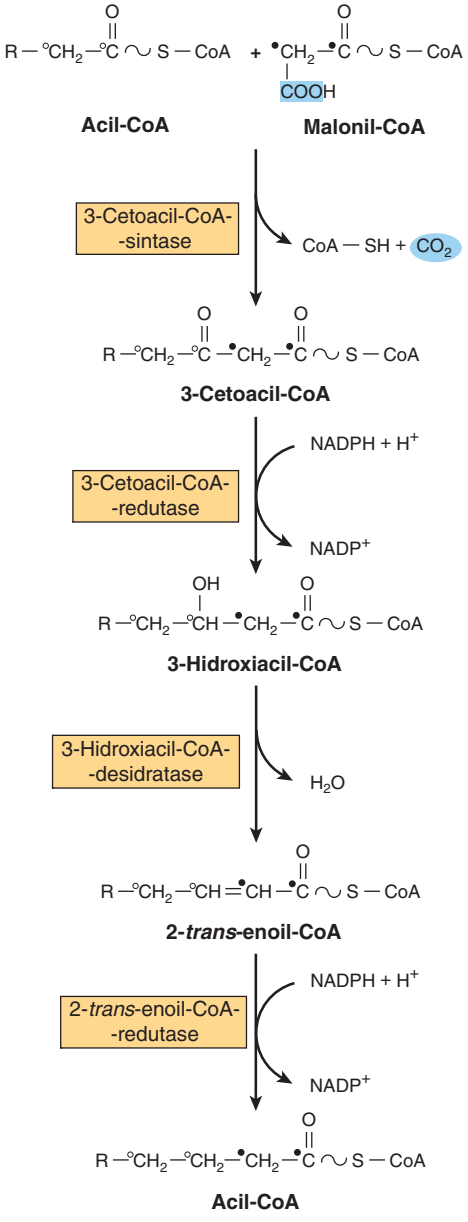


FIGURA 23-5 Sistema microssomal de alongamento para o alongamento das cadeias de ácidos graxos. O NADH também é usado pelas redutases, porém o NADPH é preferido.

exemplo de inibição por retroalimentação negativa por um produto da reação (**Figura 23-6**). Por conseguinte, se houver acúmulo de acil-CoA por não ser esterificado rapidamente o suficiente, em consequência de um aumento da lipólise, ou ainda devido a um influxo de ácidos graxos livres no tecido, ela automaticamente irá reduzir a síntese de novos ácidos graxos. A acil-CoA também inibe o **transportador de tricarboxilato** mitocondrial, impedindo, assim, a ativação da enzima pelo efluxo de citrato das mitocôndrias para o citosol (Figura 23-6).

A acetil-CoA-carboxilase também é regulada por hormônios, como o **glucacon**, a **epinefrina** e a **insulina**, por meio de alterações em seu estado de fosforilação (detalhes na **Figura 23-7**).

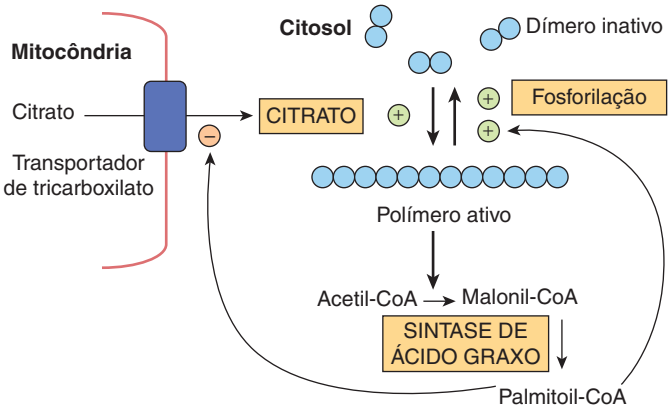


FIGURA 23-6 Regulação da acetil-CoA-carboxilase. A acetil-CoA-carboxilase é ativada pelo citrato, que promove a conversão da enzima de um dímero inativo em uma forma polimérica ativa. A inativação é promovida pela fosforilação da enzima e por moléculas de acil-CoA de cadeia longa, como palmitoil-CoA. Além disso, a acil-CoA inibe o transportador de tricarboxilato, que transporta o citrato das mitocôndrias para o citosol, diminuindo, consequentemente, a concentração de citrato no citosol e favorecendo a inativação da enzima.

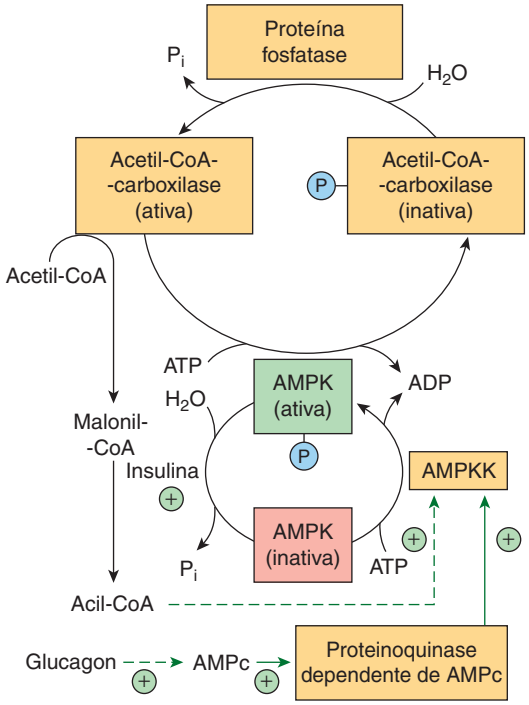


FIGURA 23-7 Regulação da acetil-CoA-carboxilase por fosforilação/desfosforilação. A enzima é inativada por fosforilação pela proteinoquinase ativada por AMP (AMPK), que, por sua vez, é fosforilada e ativada pela proteinoquinase quinase ativada por AMP (AMPKK). O glucagon (e a epinefrina) aumentam o AMPc e, portanto, ativam esta última enzima por meio da proteinoquinase dependente de AMPc. Acredita-se também que a enzima quinase quinase seja ativada pela acil-CoA. A insulina ativa a acetil-CoA-carboxilase pela desfosforilação da AMPK.

A piruvato-desidrogenase também é regulada pela acil-CoA

A acil-CoA provoca inibição da piruvato-desidrogenase ao inibir o transportador de troca de ATP-ADP da membrana mitocondrial interna, levando a um aumento da razão (ATP)/(ADP) mitocondrial e, portanto, à conversão da piruvato-desidrogenase ativa em sua forma inativa (ver Figura 18-6), regulando, dessa maneira, a disponibilidade de acetil-CoA para a lipogênese. Além disso, a oxidação da acil-CoA devido a níveis aumentados de ácidos graxos livres pode aumentar as razões de (acetil-CoA)/(CoA) e (NADH)/(NAD^+) nas mitocôndrias, inibindo a piruvato-desidrogenase.

A insulina também regula a lipogênese por outros mecanismos

A **insulina** estimula a lipogênese por vários outros mecanismos, bem como pelo aumento da atividade da acetil-CoA-carboxilase. Ela intensifica o transporte de glicose para o interior das células (p. ex., no tecido adiposo), aumentando a disponibilidade tanto de piruvato para a síntese de ácidos graxos quanto de glicerol 3-fosfato para a esterificação dos ácidos graxos recém-formados; além disso, converte a forma inativa da piruvato-desidrogenase em sua forma ativa no tecido adiposo, mas não no fígado. A insulina – em virtude de sua capacidade de reduzir os níveis intracelulares de AMPc – também **inibe a lipólise** no tecido adiposo, reduzindo, assim, a concentração plasmática de ácidos graxos livres e, portanto, de acil-CoA de cadeia longa, os quais são inibidores da lipogênese.

O complexo da sintase de ácido graxo e a acetil-CoA-carboxilase são enzimas adaptativas

Essas enzimas adaptam-se às necessidades fisiológicas do corpo ao aumentar a sua quantidade total no estado alimentado e ao diminuí-la durante o consumo de uma dieta rica em gordura, bem como em determinadas condições, como jejum e diabetes melito. A **insulina** é um importante hormônio que provoca a expressão gênica e a indução da biossíntese de enzimas, enquanto o **glucagon** (por meio do AMPc) antagoniza esse efeito. A ingestão de gorduras contendo ácidos graxos poli-insaturados regula de modo coordenado a inibição da expressão de enzimas-chave da glicólise e da lipogênese. Esses mecanismos para uma regulação mais prolongada da lipogênese levam vários dias para se manifestar por completo e aumentam o efeito direto e imediato dos ácidos graxos livres e de hormônios, como a insulina e o glucagon.

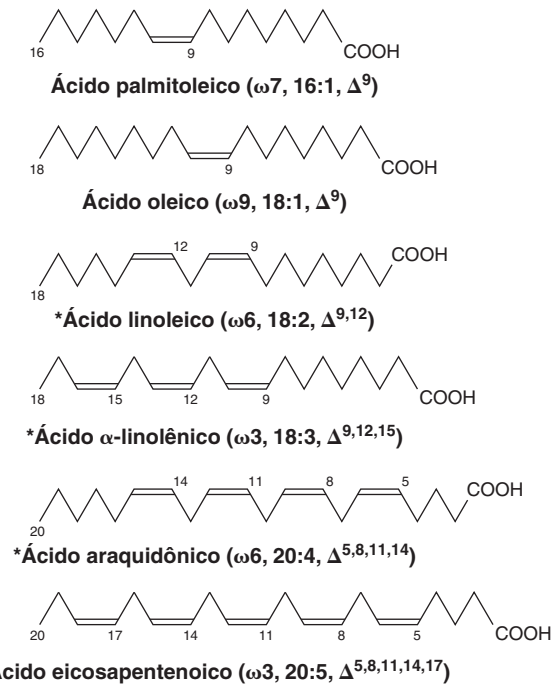


FIGURA 23-8 Estrutura de alguns ácidos graxos insaturados. Embora os átomos de carbono nas moléculas sejam numerados de modo convencional – isto é, a partir da extremidade carboxiterminal –, os números ω (p. ex., ω7 no ácido palmitoleico) são calculados a partir da extremidade oposta (metil terminal) das moléculas. A informação entre parênteses mostra, por exemplo, que o ácido α-linolênico contém duplas ligações que começam no terceiro carbono a partir da extremidade metil, é formado de 18 carbonos e 3 ligações duplas, estando essas três ligações duplas nos carbonos 9, 12 e 15 a partir da extremidade carboxiterminal. (*Classificados como "ácidos graxos essenciais".)

ALGUNS ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS NÃO PODEM SER SINTETIZADOS PELOS MAMÍFEROS E SÃO NUTRICIONALMENTE ESSENCIAIS

A **Figura 23-8** mostra alguns ácidos graxos insaturados de cadeia longa de importância metabólica nos mamíferos. Outros ácidos graxos polienoicos C_{20}, C_{22} e C_{24} podem derivar dos ácidos oleico, linoleico e α-linolênico por alongamento da cadeia. Os ácidos palmitoleico e oleico não são essenciais na dieta, visto que os tecidos podem introduzir uma dupla ligação na posição Δ^9 de um ácido graxo saturado. Os **ácidos linoleico e α-linolênico** são os únicos ácidos graxos conhecidos como essenciais para a nutrição completa de muitas espécies de animais, inclusive os seres humanos, e são denominados **ácidos graxos nutricionalmente essenciais**. Na maioria dos mamíferos, o **ácido araquidônico** pode ser formado a partir do ácido linoleico (Figura 23-11). Duplas ligações podem ser introduzidas nas posições Δ^4, Δ^5, Δ^6 e Δ^9 (ver Capítulo 15) na maioria dos animais, porém nunca além da posição Δ^9. Em contrapartida, as plantas são capazes de sintetizar os ácidos graxos nutricionalmente essenciais pela introdução de duplas ligações nas posições Δ^{12} e Δ^{15}.

OS ÁCIDOS GRAXOS MONOINSATURADOS SÃO SINTETIZADOS POR UM SISTEMA DE Δ^9-DESSATURASE

Vários tecidos, incluindo o fígado, são considerados responsáveis pela formação de ácidos graxos monoinsaturados não essenciais a partir de ácidos graxos saturados. A primeira ligação dupla

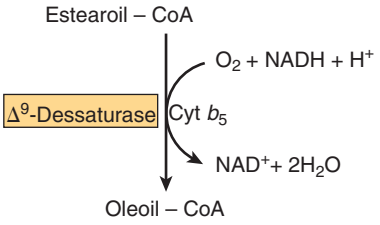


FIGURA 23-9 Δ^9-Dessaturase microssomal.

introduzida em um ácido graxo saturado está quase sempre na posição Δ^9. Um sistema enzimático – a **Δ^9-dessaturase** (**Figura 23-9**) – presente no retículo endoplasmático, catalisa a conversão de palmitoil-CoA ou estearoil-CoA em palmitoleoil-CoA ou oleoil-CoA, respectivamente. É necessária a presença de oxigênio e de NADH ou NADPH para a reação. As enzimas parecem ser semelhantes a um sistema de mono-oxigenase envolvendo o citocromo b_5 (Capítulo 12).

A SÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS ENVOLVE OS SISTEMAS ENZIMÁTICOS DE DESSATURASE E ALONGASE

As duplas ligações adicionais introduzidas em ácidos graxos monoinsaturados existentes estão sempre separadas umas das outras por um grupo metileno (metileno interrompido), exceto nas bactérias. Como os animais possuem uma Δ^9-dessaturase, eles são capazes de sintetizar completamente a família ω9 (ácido oleico) de ácidos graxos insaturados por uma combinação de alongamento da cadeia e dessaturação (**Figura 23-10**). Entretanto, conforme já assinalado, os ácidos linoleico (ω6) ou α-linolênico (ω3), os quais são necessários para a síntese dos outros membros das famílias ω6 e ω3, precisam ser supridos na dieta. O linoleato pode ser convertido em araquidonato por meio do **γ-linolenato**, pela via ilustrada na **Figura 23-11**. Por conseguinte, pode-se prescindir da necessidade nutricional de araquidonato se houver uma quantidade adequada de linoleato na dieta. O sistema de dessaturação e de alongamento da cadeia diminui acentuadamente no estado de jejum, em resposta à administração de glucagon e epinefrina e na ausência de insulina, como ocorre no diabetes melito do tipo 1.

SINTOMAS DE DEFICIÊNCIA SÃO PRODUZIDOS QUANDO OS ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS (AGE) ESTÃO AUSENTES NA DIETA

Ratos alimentados com uma dieta não lipídica purificada contendo vitaminas A e D exibem uma redução da velocidade de crescimento e deficiência de reprodução, que podem ser curadas pela adição dos **ácidos linoleico**, **α-linolênico** e **araquidônico** à dieta. Esses ácidos graxos são encontrados em altas concentrações nos óleos vegetais (Tabela 15-2) e em pequenas quantidades em carcaças de animais. Os ácidos graxos essenciais são necessários para a formação de prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas (ver adiante), e também desempenham várias outras funções que não estão tão bem definidas. São encontrados nos lipídeos estruturais das células, frequentemente na posição 2 dos fosfolipídeos, e participam na integridade estrutural da membrana mitocondrial.

O ácido araquidônico está presente nas membranas e responde por 5 a 15% dos ácidos graxos nos fosfolipídeos. O ácido docosa-hexenoico (DHA; ω3, 22:6), sintetizado em grau limitado a partir do ácido α-linolênico e obtido diretamente dos óleos de peixe, é encontrado em altas concentrações na retina, no córtex cerebral, nos testículos e no esperma. O DHA é particularmente necessário para o desenvolvimento do cérebro e da retina e é fornecido pela placenta e pelo leite. Pacientes com **retinite pigmentar** apresentam baixos níveis sanguíneos de DHA. Na **deficiência de ácidos graxos essenciais**, os ácidos polienoicos não essenciais da família ω9, particularmente o ácido $\Delta^{5,8,11}$-eicosatrienoico (ω9, 20:3) (Figura 23-10), substituem os ácidos graxos essenciais nos fosfolipídeos, em outros lipídeos complexos e nas membranas. A razão trieno:tetraeno nos lipídeos plasmáticos pode ser usada para diagnosticar o grau de deficiência de ácidos graxos essenciais.

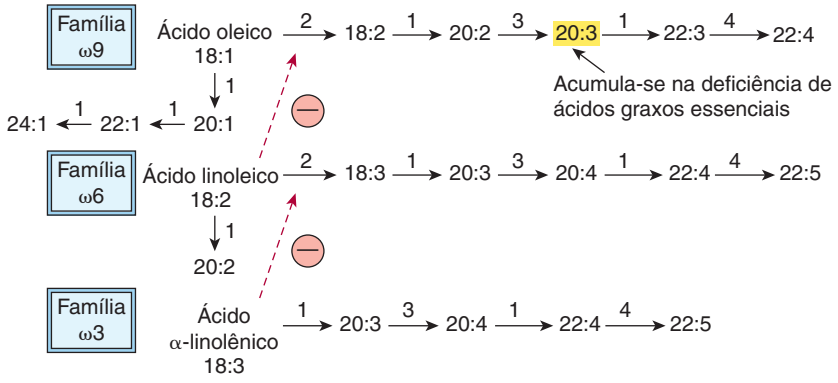


FIGURA 23-10 Biossíntese das famílias ω9, ω6 e ω3 de ácidos graxos poli-insaturados. Cada etapa é catalisada pelo sistema microssomal de alongamento da cadeia ou dessaturase: 1, alongase; 2, Δ^6-dessaturase; 3, Δ^5-dessaturase; 4, Δ^4-dessaturase. (⊖, inibição.)

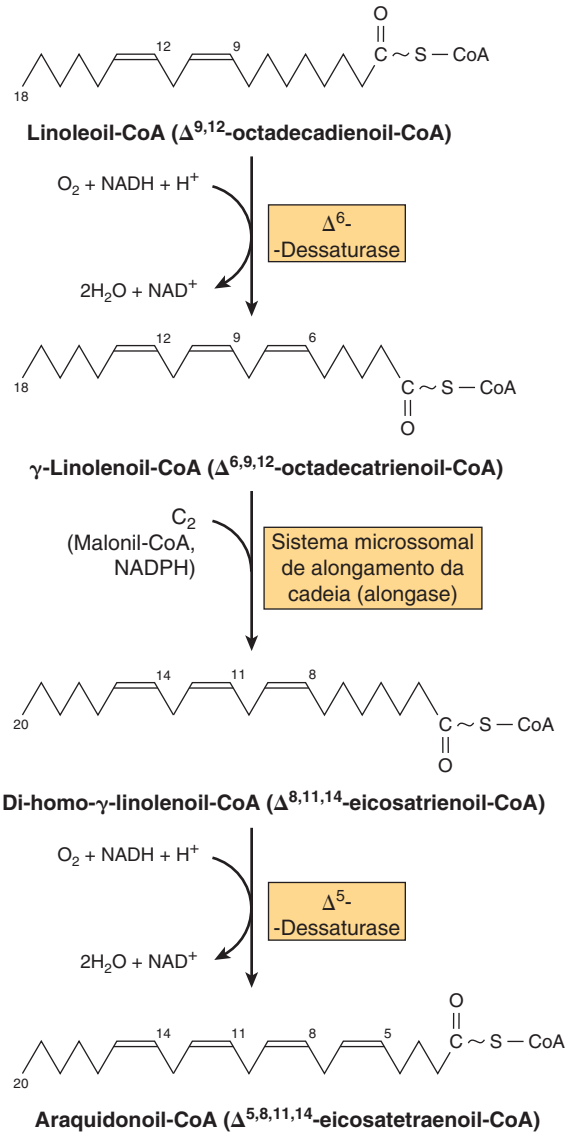


FIGURA 23-11 Conversão do linoleato em araquidonato. Os gatos são incapazes de efetuar essa conversão, devido à ausência da Δ^6-dessaturase; devem obter o araquidonato na dieta.

Os ácidos graxos *trans* estão implicados em vários distúrbios

Pequenas quantidades de ácidos graxos transinsaturados são encontradas na gordura de ruminantes (p. ex., a gordura da manteiga contém de 2 a 7%), nos quais são formados a partir da ação de microrganismos no rúmen, porém a principal fonte na dieta humana provém de óleos vegetais parcialmente hidrogenados (p. ex., margarina). Os ácidos graxos *trans* competem com os ácidos graxos essenciais e podem exacerbar a deficiência de ácidos graxos essenciais. Além disso, assemelham-se, na sua estrutura, aos ácidos graxos saturados (Capítulo 15) e exercem efeitos comparáveis na promoção da hipercolesterolemia e da aterosclerose (Capítulo 26).

OS EICOSANOIDES SÃO FORMADOS A PARTIR DE ÁCIDOS GRAXOS C_{20} POLI-INSATURADOS

O araquidonato e alguns outros ácidos graxos C_{20} poli-insaturados dão origem aos **eicosanoides**, compostos fisiológica e farmacologicamente ativos, conhecidos como **prostaglandinas** (**PG**), **tromboxanos** (**TX**), **leucotrienos** (**LT**) e **lipoxinas** (**LX**) (Capítulo 15). Fisiologicamente, são considerados como hormônios locais em sua ação, atuando por meio de receptores ligados à proteína G para produzir seus efeitos bioquímicos.

Existem três grupos de eicosanoides que são sintetizados a partir de ácidos eicosanoicos C_{20} derivados dos ácidos graxos essenciais, **linoleato** e **α-linolenato**, ou diretamente a partir do araquidonato e do eicosapentaenoato, encontrados da dieta (**Figura 23-12**). O araquidonato pode ser obtido a partir da dieta, mas habitualmente deriva da posição 2 dos fosfolipídeos na membrana plasmática, pela ação da fosfolipase A_2 (Figura 24-6), e é o substrato para a síntese das séries PG_2, TX_2 (**prostanoides**) pela **via da ciclo-oxigenase**, ou das séries LT_4 e LX_4 pela **via da lipoxigenase**, competindo, as duas vias, pelo substrato araquidonato (Figura 23-11).

A VIA DA CICLO-OXIGENASE É RESPONSÁVEL PELA SÍNTESE DE PROSTANOIDES

A síntese de prostanoides (**Figura 23-13**) envolve o consumo de duas moléculas de O_2, catalisada pela **ciclo-oxigenase** (**COX**) (também denominada **prostaglandina H sintase**), enzima que possui duas atividades, uma **ciclo-oxigenase** e uma **peroxidase**. A COX ocorre na forma de duas isoenzimas, a **COX-1** e a **COX-2**. O produto, um endoperóxido (PGH), é convertido em prostaglandinas D e E, bem como em tromboxano (TXA_2) e prostaciclina (PGI_2). Cada tipo celular produz apenas um tipo de prostanoide. O **ácido acetilsalicílico**, um AINE, inibe a COX-1 e a COX-2. Outros AINEs incluem a **indometacina** e o **ibuprofeno**, e geralmente inibem a ciclo-oxigenase pela sua competição com o araquidonato. Como a inibição da COX-1 causa a irritação gástrica, frequentemente associada ao uso de AINEs, foram feitas tentativas para desenvolver fármacos que inibem seletivamente a COX-2 (**coxibes**). Lamentavelmente, entretanto, o sucesso dessa abordagem foi limitado, e alguns coxibes foram retirados ou suspensos do mercado, devido a efeitos colaterais indesejáveis e problemas de segurança. A transcrição da COX-2 – mas não da COX-1 – é totalmente inibida pelos **corticosteroides anti-inflamatórios**.

Os ácidos graxos essenciais não exercem todos seus efeitos fisiológicos por meio da síntese de prostaglandinas

O papel dos ácidos graxos essenciais na formação da membrana não está relacionado com a síntese de prostaglandinas. As pros-

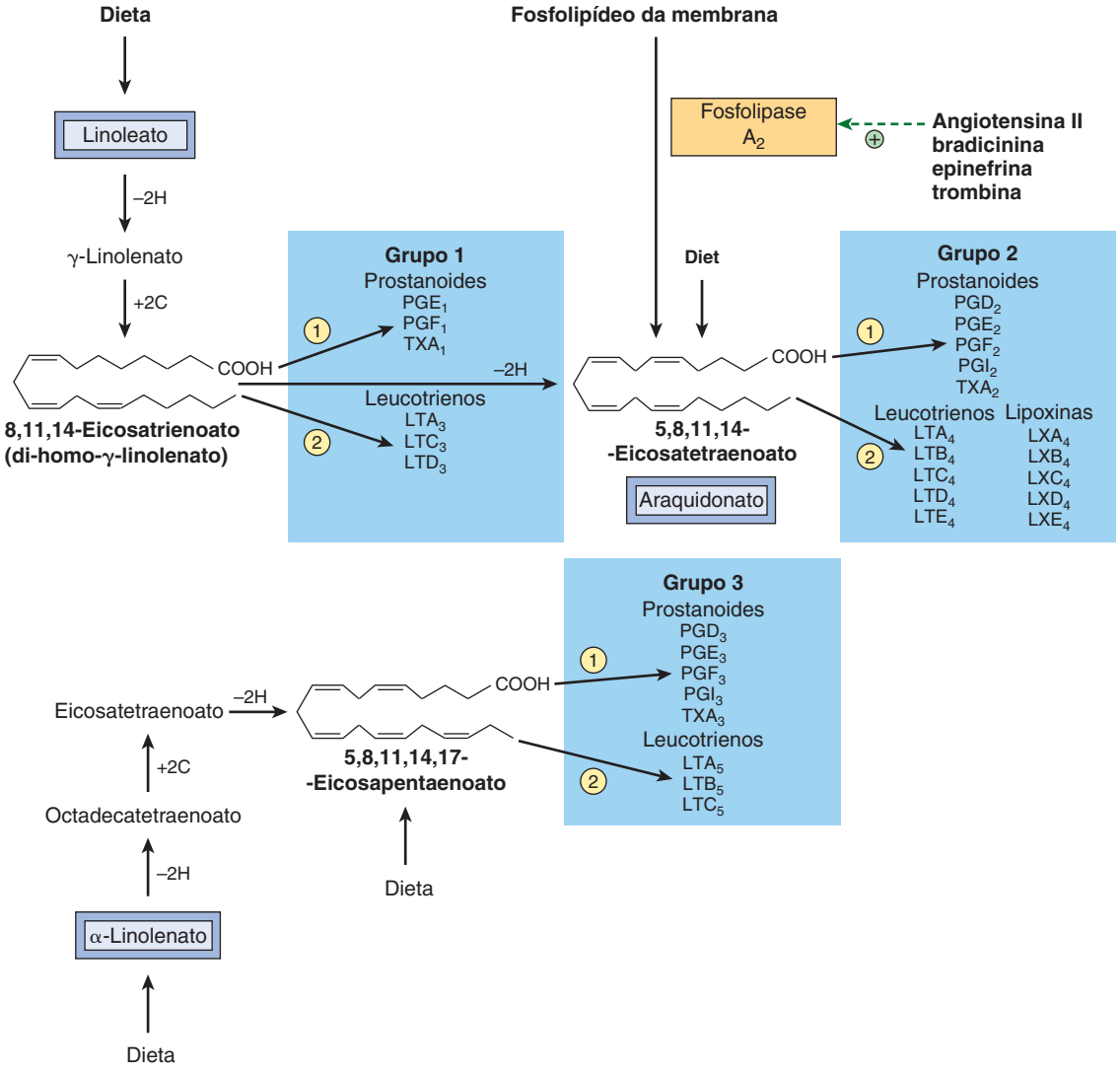


FIGURA 23-12 Os três grupos de eicosanoides e suas origens biossintéticas. (1, via da ciclo-oxigenase; 2, via da lipoxigenase; LT, leucotrieno; LX, lipoxina; PG, prostaglandina; PGI, prostaciclina; TX, tromboxano.) O subscrito denota o número total de duplas ligações na molécula e a série à qual pertence o composto.

taglandinas não aliviam os sintomas da deficiência de ácidos graxos essenciais, e a inibição da síntese de prostaglandinas não provoca deficiência de ácidos graxos essenciais.

A ciclo-oxigenase é uma "enzima suicida"

O bloqueio da atividade das prostaglandinas é obtida, em parte, por uma notável propriedade da ciclo-oxigenase – sua destruição autocatalisada, isto é, trata-se de uma "**enzima suicida**". Além disso, a inativação das prostaglandinas pela **15-hidroxiprostaglandina-desidrogenase** é rápida. O bloqueio da ação dessa enzima com sulfassalazina ou com indometacina pode prolongar a meia-vida das prostaglandinas no corpo.

OS LEUCOTRIENOS E AS LIPOXINAS SÃO FORMADOS PELA VIA DA LIPOXIGENASE

Os **leucotrienos** compreendem uma família de trienos conjugados formados a partir de ácidos eicosanoicos pela **via da lipoxigenase** nos leucócitos, em células de mastocitoma, nas plaquetas e nos macrófagos, em resposta a estímulos tanto imunológicos quanto não imunológicos. Três lipoxigenases diferentes (dioxigenases) introduzem o oxigênio nas posições 5, 12 e 15 do ácido araquidônico, dando origem aos hidroperóxidos (HPETE). Apenas a **5-lipoxigenase** forma leucotrienos (detalhes na **Figura 23-14**). As **lipoxinas** formam uma família de tetraenos conjugados, que também se originam nos leucócitos. São formadas pela ação combinada de mais de uma lipoxigenase (Figura 23-14).

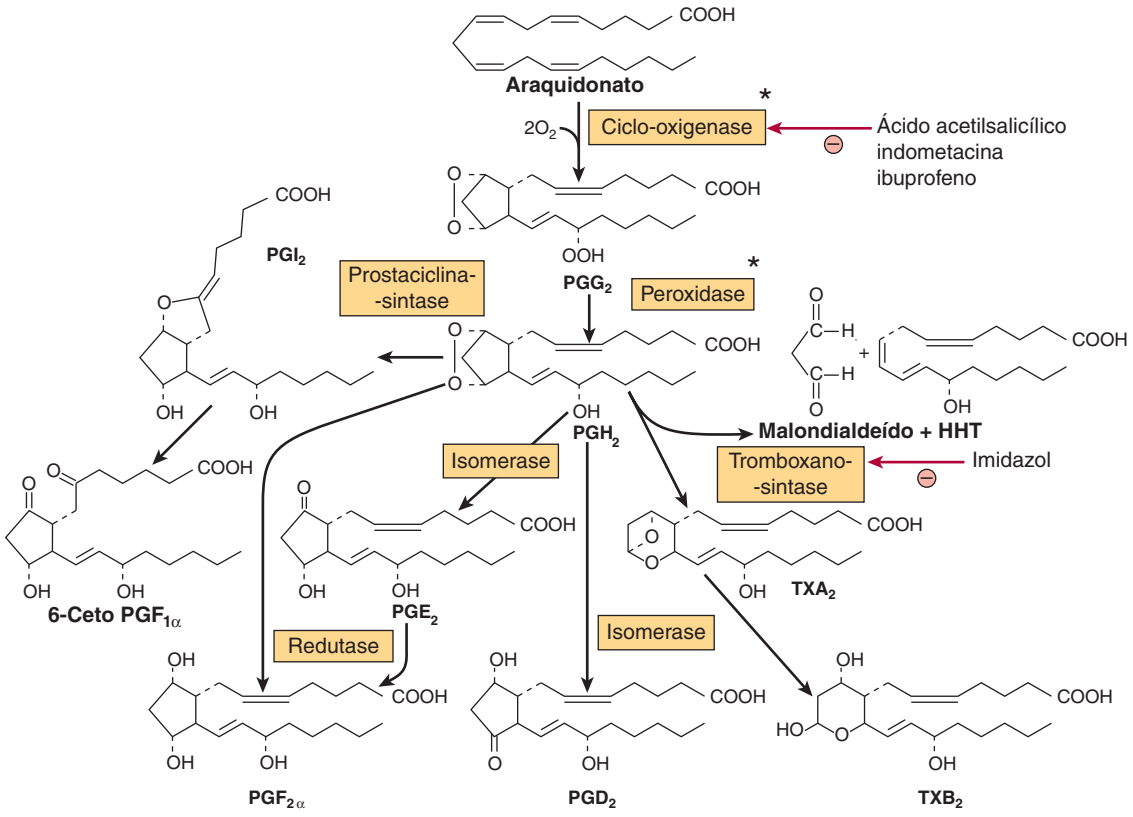


FIGURA 23-13 Conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos da série 2. (HHT, hidroxi-heptadecatrienoato; PG, prostaglandina; PGI, prostaciclina; TX, tromboxano.) (*Ambas essas atividades indicadas com asterisco são atribuídas à enzima ciclo-oxigenase [prostaglandina H sintase]. Ocorrem conversões semelhantes nas prostaglandinas e tromboxanos das séries 1 e 3.)

ASPECTOS CLÍNICOS

Os sintomas de deficiência de ácidos graxos essenciais nos seres humanos incluem lesões cutâneas e comprometimento do transporte de lipídeos

Em adultos que subsistem com dietas comuns, não se relata nenhum sinal de deficiência de ácidos graxos essenciais. Entretanto, lactentes alimentados com dietas artificiais contendo baixos teores de gordura, e pacientes mantidos por longos períodos de tempo exclusivamente com nutrição intravenosa pobre em ácidos graxos essenciais apresentam sintomas de deficiência, que podem ser evitados por um aporte de ácidos graxos essenciais correspondendo a 1 a 2% das necessidades calóricas totais.

Ocorre metabolismo anormal dos ácidos graxos essenciais em várias doenças

Foi observado um metabolismo anormal dos ácidos graxos essenciais, o que pode estar relacionado a uma insuficiência dietética, na fibrose cística, na acrodermatite enteropática, na síndrome hepatorrenal, na síndrome de Sjögren-Larsson, na degeneração neuronal multissistêmica, na doença de Crohn, na cirrose, no alcoolismo e na síndrome de Reye. Foram encontrados níveis elevados de ácidos polienoicos de cadeia muito longa no cérebro de pacientes com síndrome de Zellweger (Capítulo 22). As dietas com alta razão P:S (ácidos graxos poli-insaturados:saturados) reduzem os níveis séricos de colesterol e são consideradas benéficas em relação ao risco de desenvolvimento de coronariopatia.

Os prostanoides são substâncias potentes e biologicamente ativas

Os **tromboxanos** são sintetizados nas plaquetas e, com a sua liberação, causam vasoconstrição e agregação plaquetária. Sua síntese é especificamente inibida pelo ácido acetilsalicílico administrado em baixas doses. As **prostaciclinas** (**PGI_2**) são produzidas pelas paredes dos vasos sanguíneos e atuam como potentes inibidores da agregação plaquetária. Portanto, os tromboxanos e as prostaciclinas são antagonistas. A PG_3 e o TX_3, formados a partir do ácido eicosapentaenoico (EPA), inibem a liberação do araquidonato dos lipídeos, bem como a formação de PG_2 e TX_2. A PGI_3 é tão potente quanto a PGI_2 como antiagregador plaquetário, enquanto o TXA_3 é um agregador mais fraco do que o TXA_2, modificando o equilíbrio da atividade e favorecendo tempos de coagulação mais longos. Apenas 1 ng/mL de prostaglandinas plasmáticas provoca contração do músculo liso nos animais. Os usos terapêuticos potenciais incluem a prevenção da concepção, a indução do trabalho de parto a termo, a interrupção da gravidez, a prevenção ou o alívio de úlceras gástricas, o controle da

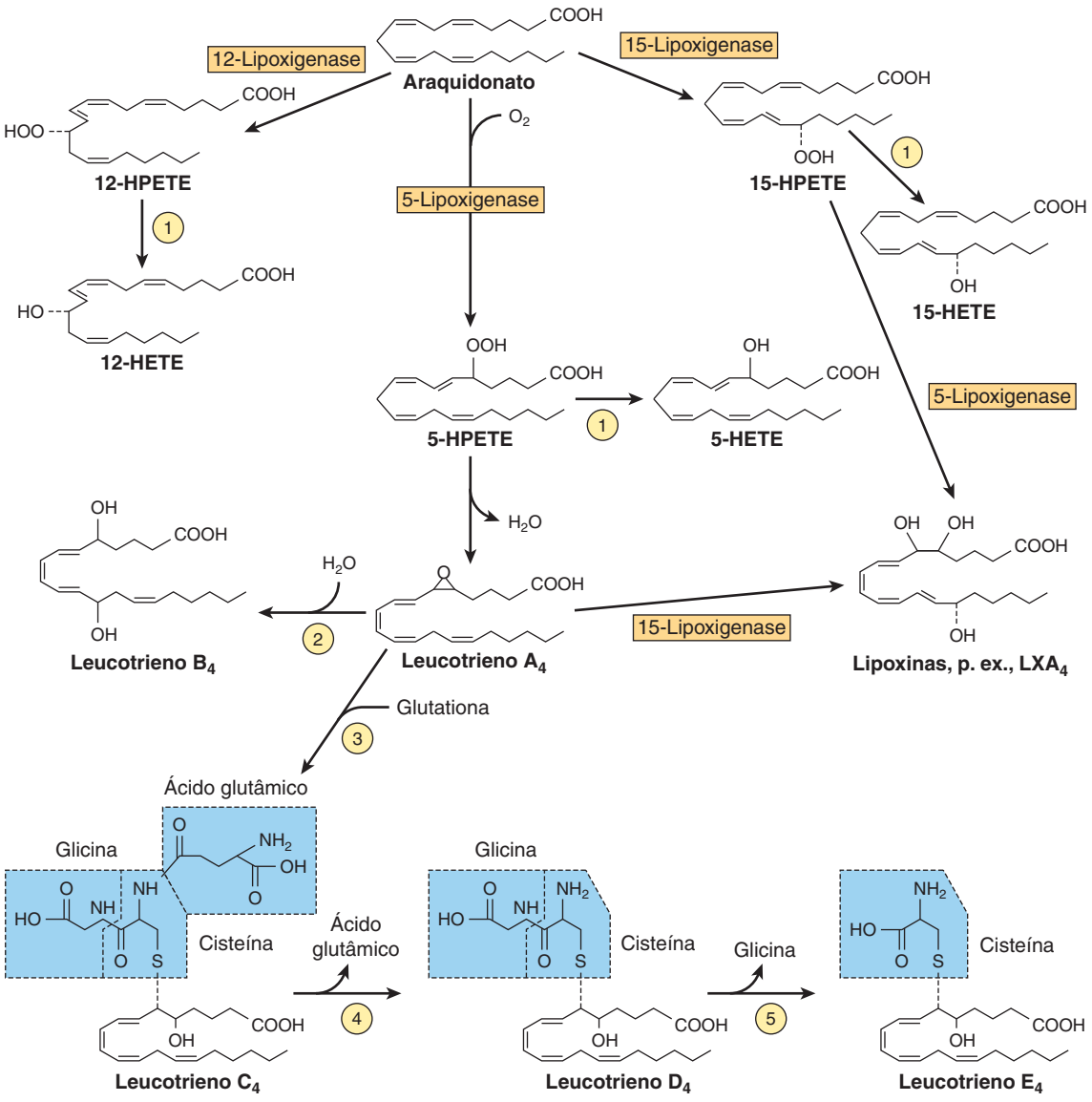


FIGURA 23-14 Conversão do ácido araquidônico em leucotrienos e lipoxinas da série 4 pela via da lipoxigenase. Ocorrem algumas conversões semelhantes nas séries 3 e 5 dos leucotrienos. (1, peroxidase; 2, leucotrieno A_4 epóxido-hidrolase; 3, glutationa-*S*-transferase; 4, γ-glutamiltranspeptidase; 5, cisteinil-glicina-dipeptidase; HETE, hidroxieicosatetraenoato; HPETE, hidroperoxieicosatetraenoato.)

inflamação e da pressão arterial e o alívio da asma e da congestão nasal. Além disso, a PGD_2 é uma potente substância que promove o sono. As prostaglandinas aumentam o AMPc nas plaquetas, na tiroide, no corpo lúteo, nos ossos fetais, na adeno-hipófise e nos pulmões, porém o reduzem nas células tubulares renais e no tecido adiposo (Capítulo 25).

Os leucotrienos e as lipoxinas são potentes reguladores de muitos processos patológicos

A substância de reação lenta da anafilaxia (**SRS-A**) é uma mistura de leucotrienos C_4, D_4 e E_4. Essa mistura de leucotrienos atua como potente constritor da musculatura das vias respiratórias brônquicas. Esses leucotrienos, juntamente com o **leucotrieno B_4**, também provocam permeabilidade vascular, bem como atração e ativação dos leucócitos, e são importantes reguladores em muitas doenças, envolvendo reações inflamatórias ou de hipersensibilidade imediata, como a asma. Os leucotrienos são vasoativos, e a 5-lipoxigenase foi encontrada nas paredes das artérias. As evidências disponíveis sustentam um papel anti-inflamatório para as lipoxinas na função vasoativa e imunorreguladora, atuando, por exemplo, como compostos contrarreguladores (**calônios**) da resposta imune.

RESUMO

- A síntese de ácidos graxos de cadeia longa (lipogênese) é efetuada por dois sistemas enzimáticos: a acetil-CoA-carboxilase e a sintase de ácido graxo.

- A via converte a acetil-CoA em palmitato e requer a presença de NADPH, ATP, Mn^{2+}, biotina e ácido pantotênico como cofatores.
- A acetil-CoA-carboxilase converte a acetil-CoA em malonil-CoA, e, em seguida, a sintase de ácido graxo, um complexo multienzimático constituído de duas cadeias polipeptídicas idênticas, contendo, cada uma, seis atividades enzimáticas separadas e ACP, catalisa a formação do palmitato a partir de uma molécula de acetil-CoA e sete moléculas de malonil-CoA.
- A lipogênese é regulada na etapa da acetil-CoA-carboxilase por modificadores alostéricos, por fosforilação/desfosforilação e pela indução e repressão da síntese enzimática. A enzima é alostericamente ativada pelo citrato e desativada por acilas-CoA de cadeia longa. A desfosforilação (p. ex., pela insulina) promove a sua atividade, enquanto a fosforilação (p. ex., pelo glucagon ou epinefrina) é inibitória.
- A biossíntese de ácidos graxos insaturados de cadeia longa é efetuada pelas enzimas dessaturase e alongase que, respectivamente, introduzem ligações duplas e alongam as cadeias existentes de acil.
- Os animais superiores possuem Δ^4, Δ^5, Δ^6 e Δ^9-dessaturases, porém são incapazes de introduzir novas ligações duplas além da posição 9 dos ácidos graxos. Por conseguinte, os ácidos graxos essenciais, os ácidos linoleico (ω6) e α-linolênico (ω3), devem ser obtidos a partir da dieta.
- Os eicosanoides derivam de ácidos graxos C_{20} (eicosanoicos) sintetizados a partir dos ácidos graxos essenciais e compreendem importantes grupos de compostos fisiológica e farmacologicamente ativos, incluindo as prostaglandinas, os tromboxanos, os leucotrienos e as lipoxinas.

REFERÊNCIAS

Fischer S: Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoid formation in humans. Adv Lipid Res 1989;23:169.

Fitzpatrick FA: Cyclooxygenase enzymes: regulation and function. Curr Pharm Des 2004;10:577.

McMahon B, Mitchell S, Brady HR, et al: Lipoxins: revelations on resolution. Trends Pharmacol Sci 2001;22:391.

Miyazaki M, Ntambi JM: Fatty acid desaturation and chain elongation in mammals. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th ed. Vance DE, Vance JE (editors). Elsevier, 2008;191–212.

Sith S, Witkowski A, Joshi AK: Structural and functional organisation of the animal fatty acid synthase. Prog Lipid Res 2003;42:289.

Smith WL, Murphy RC: Th e eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathways. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th ed. Vance DE, Vance JE (editors). Elsevier, 2008;331–362.

Sul HS, Smith S: Fatty acid synthesis in eukaryotes. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th ed. Vance DE, Vance JE (editors). Elsevier, 2008;155–190.

Tong L: Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and an attractive target for drug discovery. Cell Mol Life Sci 2005;62:1784.

Wijendran V, Hayes KC: Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. Annu Rev Nutr 2004;24:597.

CAPÍTULO

24

Metabolismo dos Acilgliceróis e Esfingolipídeos

Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e
Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Reconhecer que o catabolismo dos triacilgliceróis envolve a hidrólise por uma lipase, com liberação de ácidos graxos e glicerol, e indicar o destino desses metabólitos.
- Compreender que o glicerol-3-fosfato é o substrato para a formação dos triacilgliceróis e fosfogliceróis, e que um ponto de bifurcação no fosfatidato leva à síntese de inositol fosfolipídeos e de cardiolipina por meio de um dos ramos e de triacilgliceróis e outros fosfolipídeos por meio do outro.
- Explicar a formação dos plasmalogênios e do fator de ativação das plaquetas (PAF) por uma via complexa que começa com a di-hidroxiacetona-fosfato.
- Ilustrar o papel de várias fosfolipases na degradação e no remodelamento dos fosfolipídeos.
- Reconhecer que a ceramida é produzida a partir do aminoácido serina e constitui o precursor a partir do qual são formados os esfingolipídeos.
- Indicar como a esfingomielina e os glicoesfingolipídeos são produzidos pela reação da ceramida com fosfatidilcolina (com liberação de diacilglicerol) ou resíduo(s) de açúcar, respectivamente.
- Fornecer exemplos de doenças causadas por defeitos na síntese ou na degradação de fosfolipídeos ou esfingolipídeos.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Os acilgliceróis constituem a maior parte dos lipídeos do organismo. Os triacilgliceróis representam os principais lipídeos nos depósitos de gordura do corpo e nos alimentos. O papel que desempenham no transporte e no armazenamento dos lipídeos, bem como em várias doenças, como a obesidade, o diabetes e a hiperproteinemia, será descrito nos capítulos subsequentes. Em virtude de sua natureza anfipática, os fosfolipídeos e os esfingolipídeos são idealmente apropriados como principal componente lipídico das membranas celulares. Os fosfolipídeos também atuam no metabolismo de muitos outros lipídeos. Alguns fosfolipídeos desempenham funções especializadas; por exemplo, a dipalmitoil lecitina constitui um importante componente do **surfactante pulmonar**, o qual é ausente na **síndrome de angústia respiratória** do recém-nascido. Os fosfolipídeos inositóis da membrana celular atuam como precursores de **mensageiros secundários de hormônios**, e o fator de ativação das plaquetas é um alquilfosfolipídeo. Os glicoesfingolipídeos, que contêm esfingosina e resíduos de açúcar, bem como ácidos graxos, são encontrados na camada externa da membrana plasmática, com suas cadeias de oligossacarídeos voltadas para o exterior. Constituem parte do glicocálix da superfície celular e são importantes (1) na adesão e reconhecimento celulares, (2) como receptores para toxinas bacterianas (p. ex., a toxina que causa a cólera) e (3) como substâncias dos grupos sanguíneos ABO. Foram descritas 12 ou mais **doenças de armazenamento de glicolipídeos** (p. ex., doença de Gaucher e doença de Tay-Sachs), cada uma delas decorrente de um defeito genético na via de degradação dos glicolipídeos nos lisossomos.

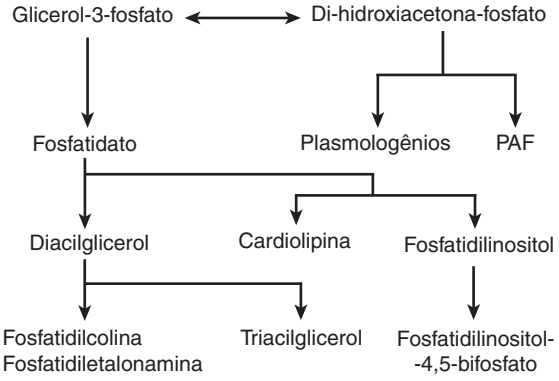


FIGURA 24-1 Visão geral da biossíntese de acilgliceróis. (PAF, fator de ativação das plaquetas.)

A HIDRÓLISE INICIA O CATABOLISMO DOS TRIACILGLICERÓIS

Os triacilgliceróis devem ser hidrolisados por uma **lipase** em seus constituintes, ácidos graxos e glicerol, antes que possa ocorrer catabolismo adicional. Grande parte dessa hidrólise (lipólise) ocorre no tecido adiposo, com liberação de ácidos graxos livres no plasma, onde são encontrados em combinação com a albumina sérica (Figura 25-7). Em seguida, ocorre captação dos ácidos graxos livres pelos tecidos (incluindo fígado, coração, rim, músculo, pulmão, testículos e tecido adiposo, mas não prontamente pelo cérebro), onde são oxidados ou reesterificados. A utilização do glicerol depende da presença, nesses tecidos, da enzima **glicerol-quinase**, que é encontrada em quantidades significativas no fígado, no rim, no intestino, no tecido adiposo marrom e na glândula mamária em lactação.

OS TRIACILGLICERÓIS E OS FOSFOGLICERÓIS SÃO FORMADOS POR ACILAÇÃO DE TRIOSE-FOSFATOS

As principais vias de biossíntese dos triacilgliceróis e fosfogliceróis estão esquematizadas na **Figura 24-1**. Substâncias importantes, como os triacilgliceróis, a fosfatidilcolina, a fosfatidiletalonamina, o fosfatidilinositol e a cardiolipina, um constituinte das membranas mitocondriais, são formadas a partir do **glicerol-3-fosfato**. São observados pontos de bifurcação importantes na via, nas etapas do fosfatidato e do diacilglicerol. Os fosfogliceróis que contêm uma ligação éter (−C−O−C−), dos quais os mais conhecidos são os plasmalogênios e o fator de ativação das plaquetas (PAF), derivam da di-hidroxiacetona-fosfato. O glicerol-3-fosfato e a di-hidroxiacetona-fosfato são intermediários da glicólise, estabelecendo uma conexão muito importante entre o metabolismo dos carboidratos e dos lipídeos (ver Capítulo 16).

O fosfatidato é o precursor comum na biossíntese dos triacilgliceróis, de muitos fosfogliceróis e da cardiolipina

Tanto o glicerol quanto os ácidos graxos devem ser ativados pelo ATP antes que possam ser incorporados em acilgliceróis. A **glicerol-quinase** catalisa a ativação do glicerol em *sn*-glicerol-3-fosfato. Se a atividade dessa enzima estiver ausente ou baixa, como no músculo ou no tecido adiposo, a maior parte do glicerol-3-fosfato é formada a partir da di-hidroxiacetona fosfato **pela glicerol-3-fosfato-desidrogenase** (**Figura 24-2**).

Biossíntese dos triacilgliceróis

Duas moléculas de acil-CoA, formadas pela ativação de ácidos graxos pela **acil-CoA-sintetase** (Capítulo 22), combinam-se com o glicerol-3-fosfato para formar o **fosfatidato** (1,2-diacilglicerol fosfato). Essa reação ocorre em dois estágios, catalisados pela **glicerol-3-fosfato-aciltransferase** e pela **1-acilglicerol-3-fosfato-aciltransferase**. O fosfatidato é convertido pela **fosfatidato-fosfo-hidrolase** e pela **diacilglicerol-aciltransferase** (**DGAT**) em 1,2-diacilglicerol e, a seguir, triacilglicerol. A DGAT catalisa a única etapa específica para a síntese de triacilglicerol, e acredita-se que seja a enzima limitadora de velocidade na maioria das circunstâncias. Na mucosa intestinal, a **monoacilglicerol-aciltransferase** converte o **monoacilglicerol** em 1,2-diacilglicerol **na via do monoacilglicerol**. A atividade dessas enzimas reside, em sua maior parte, no retículo endoplasmático, porém observa-se também alguma atividade nas mitocôndrias. Embora a fosfatidato-fosfo-hidrolase seja encontrada principalmente no citosol, a forma ativa da enzima está ligada à membrana.

Na biossíntese de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (Figura 24-2), a colina ou a etanolamina deve ser inicialmente ativada por fosforilação pelo ATP, seguida de ligação à CDP. A CDP-colina ou CDP-etalonamina resultante reage com o 1,2-diacilglicerol, formando fosfatidilcolina ou fosfatidiletanolamina, respectivamente. A fosfatidilserina é formada diretamente a partir da fosfatidiletanolamina pela sua reação com serina (Figura 24-2). A fosfatidilserina pode novamente formar fosfatidiletanolamina por descarboxilação. No fígado, uma via alternativa permite que a fosfatidiletalonamina dê origem diretamente à fosfatidilcolina por metilação progressiva do resíduo de etalonamina. Apesar dessas fontes de colina, ela é considerada um nutriente essencial em muitas espécies de mamíferos, embora isso não tenha sido estabelecido nos seres humanos.

A regulação da biossíntese de triacilglicerol, fosfatidilcolina e fosfatidiletalonamina depende da disponibilidade de ácidos graxos livres. Aqueles que escapam da oxidação são preferencialmente convertidos em fosfolipídeos; quando essa necessidade está satisfeita, os ácidos graxos livres são utilizados na síntese de triacilgliceróis.

A **cardiolipina** (difosfatidilglicerol; Figura 15-10) é um fosfolipídeo presente nas mitocôndrias. A cardiolipina é formada a partir do fosfatidilglicerol que, por sua vez, é sintetizado a partir do CDP-diacilglicerol (Figura 24-2) e do glicerol-3-fosfato, de acordo com o esquema ilustrado na **Figura 24-3**. A cardiolipina,

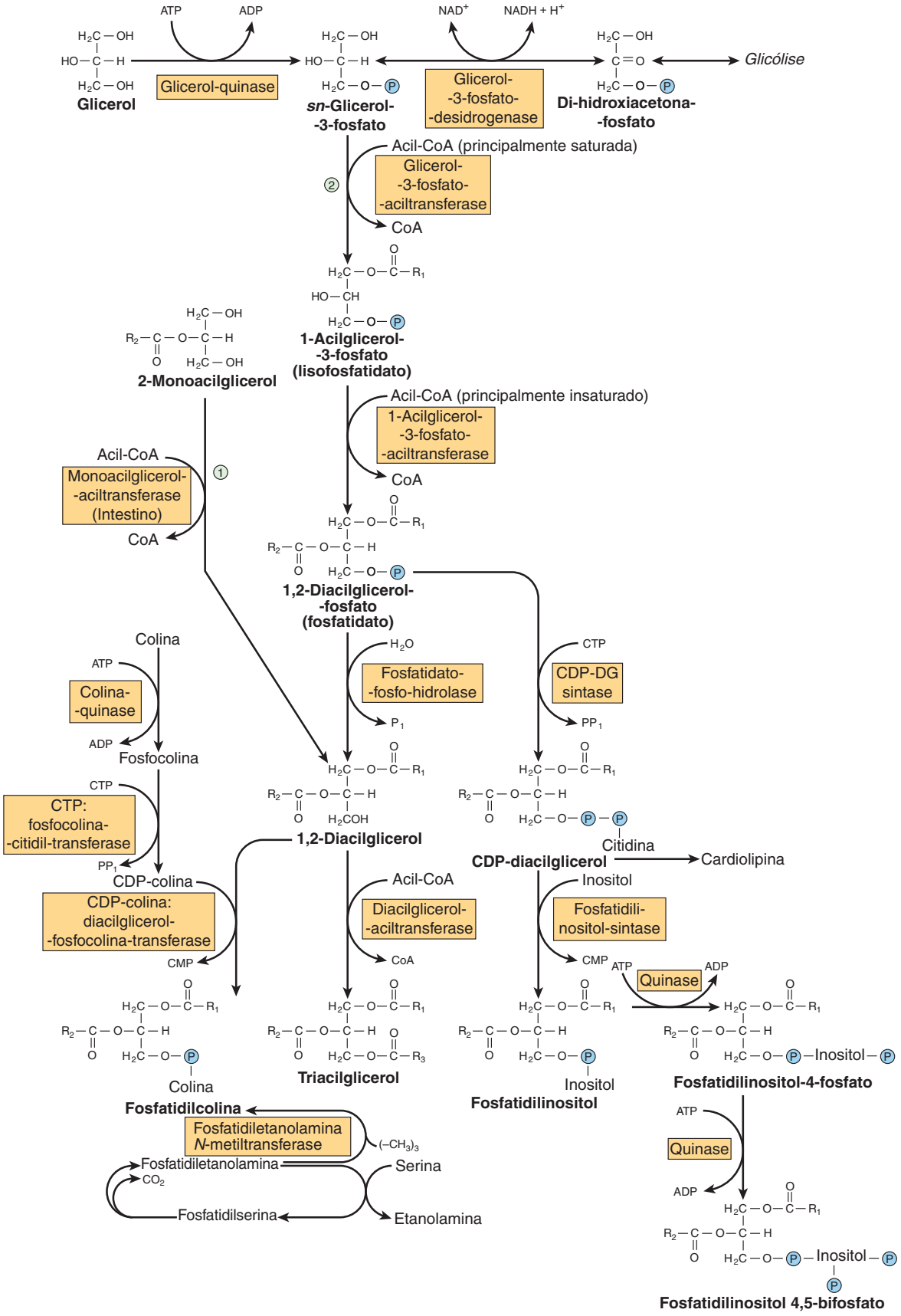


FIGURA 24-2 Biossíntese do triacilglicerol e de fosfolipídeos. (①, Via do monoacilglicerol; ②, via do glicerol-fosfato.) A fosfatidiletanolamina pode ser formada a partir da etanolamina por uma via semelhante àquela mostrada para a formação de folfatidilcolina a partir da colina.

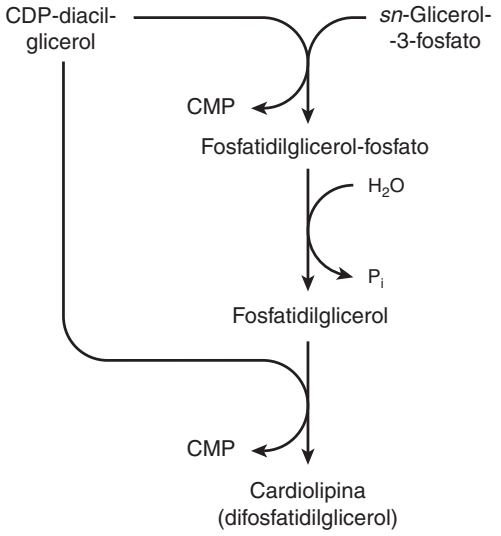


FIGURA 24-3 Biossíntese da cardiolipina.

encontrada na membrana interna das mitocôndrias, desempenha um papel essencial na estrutura e função dessas organelas, e acredita-se também que esteja envolvida na morte celular programada (**apoptose**).

Biossíntese dos éter glicerofosfolipídeos

Essa via está localizada nos peroxissomos. A di-hidroxiacetona-fosfato é o precursor da fração glicerol dos éter glicerofosfolipídeos (**Figura 24-4**). Esse composto combina-se com a acil-CoA para produzir 1-acildi-hidroxiacetona-fosfato. A ligação éter é formada na próxima reação, produzindo 1-alquildi-hidroxiacetona-fosfato, que é então convertida em 1-alquilglicerol-3-fosfato. Após mais uma acilação na posição 2, o 1-alquil-2-acilglicerol-3-fosfato resultante (análogo ao fosfatidato na Figura 24-2) é hidrolisado, dando origem ao derivado glicerol livre. Os **plasmalogênios**, que compreendem grande parte dos fosfolipídeos nas mitocôndrias, são formados pela dessaturação dos derivados análogos da 3-fosfoetanolamina (Figura 24-4). O **fator de ativação das plaquetas** (**PAF**) (1-alquil-2-acetil-*sn*-glicerol-3-fosfocolina) é sintetizado

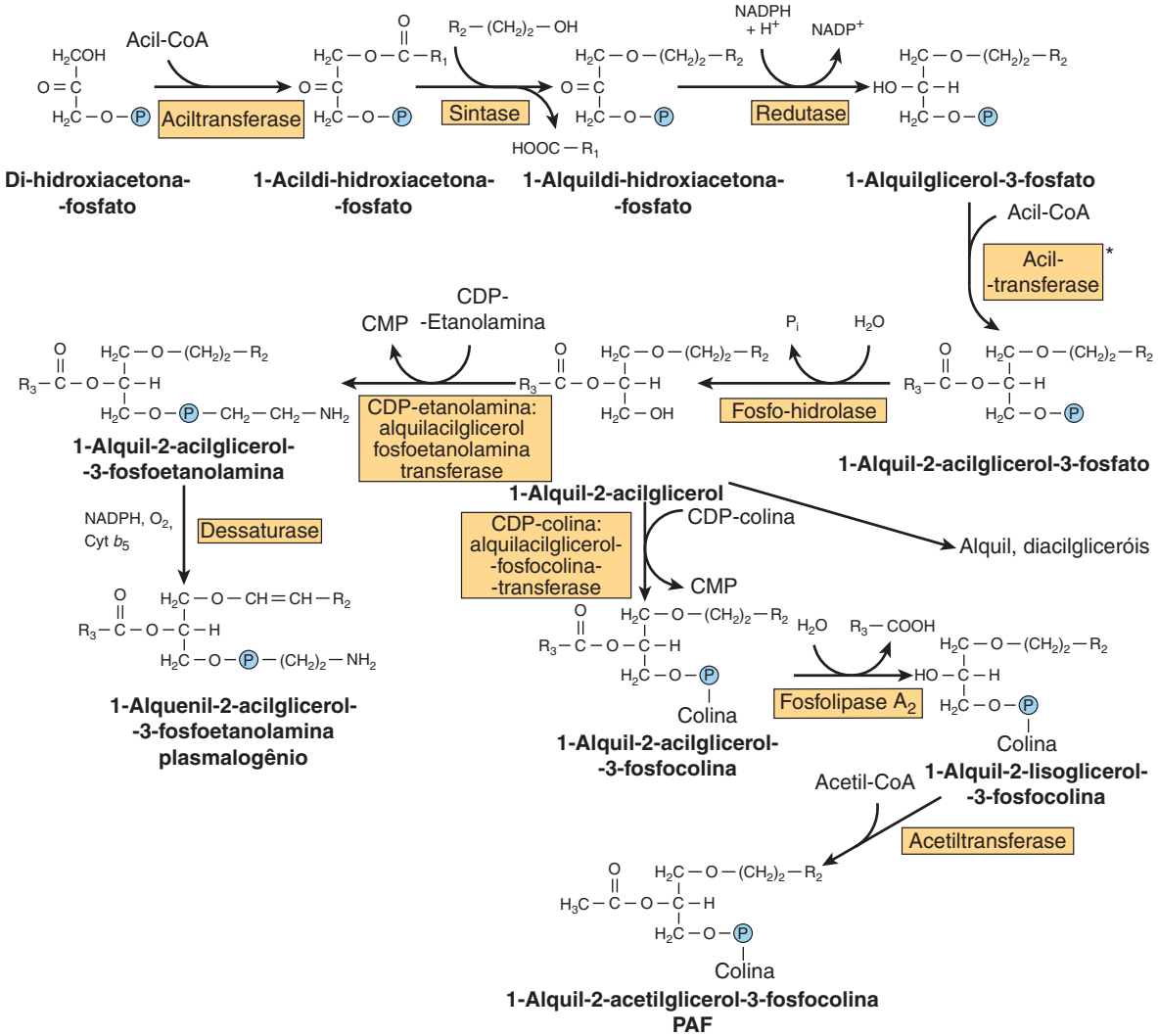


FIGURA 24-4 Biossíntese dos éter lipídeos, incluindo os plasmalogênios e o fator de ativação das plaquetas (PAF). Na via *de novo* para a síntese de PAF, a acetil-CoA é incorporado no estágio*, evitando as duas últimas etapas da via apresentada aqui.

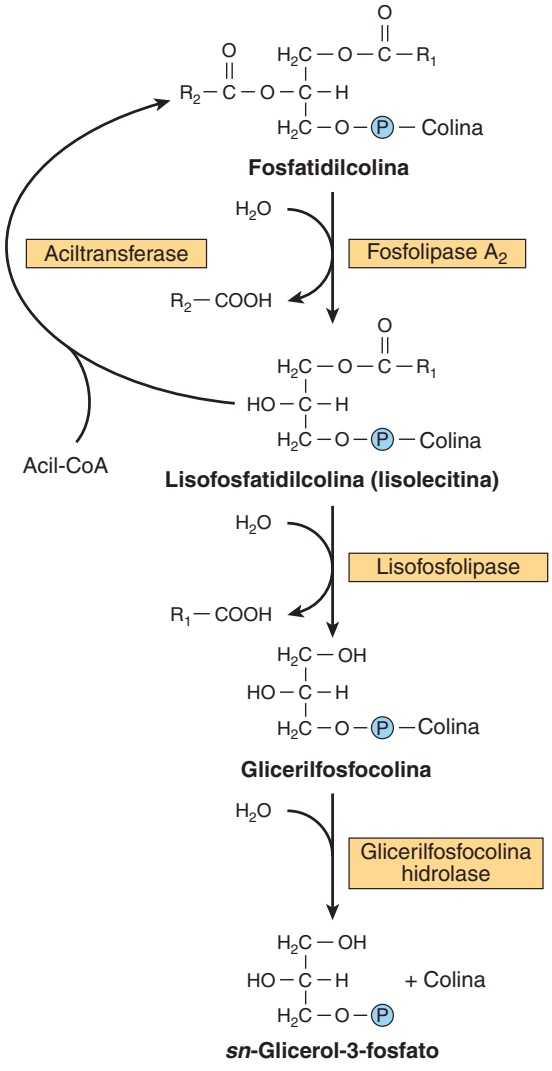


FIGURA 24-5 Metabolismo da fosfatidilcolina (lecitina).

a partir do derivado correspondente da 3-fosfocolina. O PAF é formado por muitas células sanguíneas e outros tecidos e agrega as plaquetas em concentrações baixas de apenas 10^{-11} mol/L. Além disso, apresenta propriedades hipotensoras e ulcerogênicas e está envolvido em uma variedade de respostas biológicas, incluindo inflamação, quimiotaxia e fosforilação de proteínas.

As fosfolipases possibilitam a degradação e o remodelamento dos fosfogliceróis

Embora os fosfolipídeos sejam degradados ativamente, cada parte da molécula apresenta uma renovação em velocidade diferente – por exemplo, o tempo de renovação do grupo fosfato é diferente daquele do grupo 1-acil. Isso se deve à presença de enzimas que permitem a degradação parcial da molécula, seguida de nova síntese (**Figura 24-5**). A **fosfolipase A_2** catalisa a hidrólise dos glicerofosfolipídeos, dando origem a um ácido graxo livre e a um lisofosfolipídeo que, por sua vez, pode ser novamente acilado com acil-CoA, na presença de uma aciltransferase. Alternativamente, o lisofosfolipídeo (p. ex., lisolecitina)

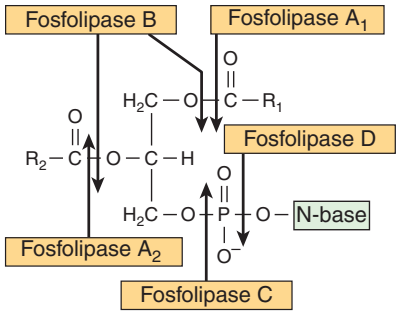


FIGURA 24-6 Locais de atividade hidrolítica das fosfolipases sobre um substrato fosfolipídeo.

é atacado pela **lisofosfolipase**, formando a base gliceril-fosforil correspondente que, por sua vez, pode ser clivada por uma hidrolase, com liberação de glicerol-3-fosfato e da base. As **fosfolipases A_1, A_2, B, C e D** atacam as ligações indicadas na **Figura 24-6**. A **fosfolipase A_2** é encontrada no suco pancreático e no veneno das serpentes, bem como em muitos tipos de células; a **fosfolipase C** é uma das principais toxinas secretadas por bactérias; e a **fosfolipase D** é conhecida pela sua participação na transdução de sinais em mamíferos.

A **lisolecitina** (**lisofosfatidilcolina**) pode ser formada por uma via alternativa que envolve a **lecitina**: **colesterol aciltransferase** (**LCAT**). Essa enzima, encontrada no plasma, catalisa a transferência de um resíduo do ácido graxo da posição 2 da lecitina para o colesterol, dando origem a um éster de colesterol e a uma lisolecitina; é considerada como responsável pela maior parte do éster de colesterol presente nas lipoproteínas plasmáticas. Os ácidos graxos saturados de cadeia longa são encontrados predominantemente na posição 1 dos fosfolipídeos, enquanto os ácidos graxos poli-insaturados (p. ex., os precursores das prostaglandinas) são incorporados mais frequentemente na posição 2. A incorporação de ácidos graxos na lecitina ocorre de três maneiras: pela síntese completa do fosfolipídeo; por transacilação entre o éster de colesterol e a lisolecitina; e por acilação direta da lisolecitina pela acil-CoA. Portanto, é possível haver uma troca contínua de ácidos graxos, particularmente no que diz respeito à introdução de ácidos graxos essenciais nas moléculas de fosfolipídeos.

TODOS OS ESFINGOLIPÍDEOS SÃO FORMADOS A PARTIR DA CERAMIDA

A **ceramida** é sintetizada no retículo endoplasmático a partir do aminoácido serina, conforme ilustrado na **Figura 24-7**. A ceramida é uma molécula de sinalização (mensageiro secundário) importante que regula diversas vias, incluindo a morte celular programada (**apoptose**), o **ciclo celular** e a **diferenciação e senescência das células**.

As **esfingomielinas** (Figura 15-13) são fosfolipídeos formados quando uma ceramida reage com a fosfatidilcolina, formando esfingomielina e diacilglicerol (**Figura 24-8A**). Isso ocorre principalmente no aparelho de Golgi e, em menor grau, na membrana plasmática.

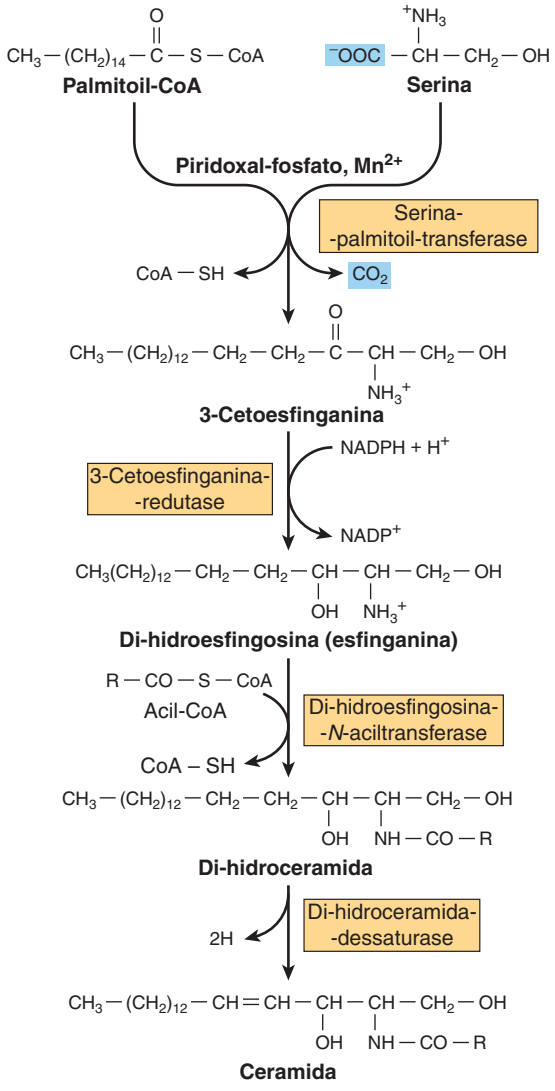


FIGURA 24-7 Biossíntese da ceramida.

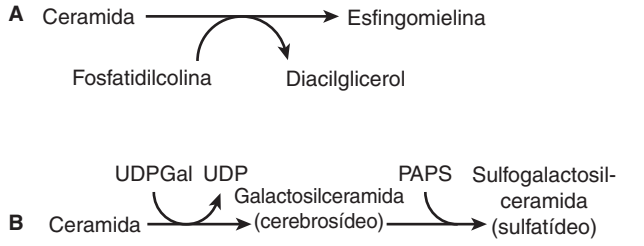


FIGURA 24-8 Biossíntese (A) da esfingomielina, (B) da galactosilceramida e do seu derivado sulfo. (PAPS, "sulfato ativo", adenosina-3′-fosfato-5′-fosfossulfato)

Os glicoesfingolipídeos são uma combinação de ceramida com um ou mais resíduos de açúcar

Os glicoesfingolipídeos mais simples (**cerebrosídeos**) são a **galactosilceramida** (**GalCer**) e a **glicosilceramida** (**GlcCer**). A GalCer é um importante lipídeo da **mielina**, enquanto a GlcCer é o principal glicoesfingolipídeo dos **tecidos extraneurais** e um precursor da maior parte dos glicoesfingolipídeos mais complexos. A GalCer (**Figura 24-8B**) é formada em uma reação entre a ceramida e a UDPGal (formada por epimerização a partir da UDPGlc; Figura 21-6).

A **sulfogalactosilceramida** e outros sulfolipídeos, como os **sulfo(galacto)-glicerolipídeos** e os **sulfatos esteroides**, são formados após reações adicionais envolvendo a 3′-fosfoadenosina-5′fosfossulfato (PAPS; "sulfato ativo"). Os **gangliosídeos** são sintetizados a partir da ceramida pela adição sequencial de açúcares ativados (p. ex., UDPGlc e UDPGal) e **ácido siálico**, habitualmente o ácido *N*-acetilneuramínico (**Figura 24-9**). Pode haver formação de um grande número de gangliosídeos com pesos moleculares crescentes. As enzimas que transferem açúcares dos nucleotídeos (glicosiltransferases) são encontradas, em sua maioria, no aparelho de Golgi.

Os **glicoesfingolipídeos** são constituintes da camada externa das membranas plasmáticas e são importantes na **adesão** e no **reconhecimento celulares**. Alguns são antígenos, como, por exem-

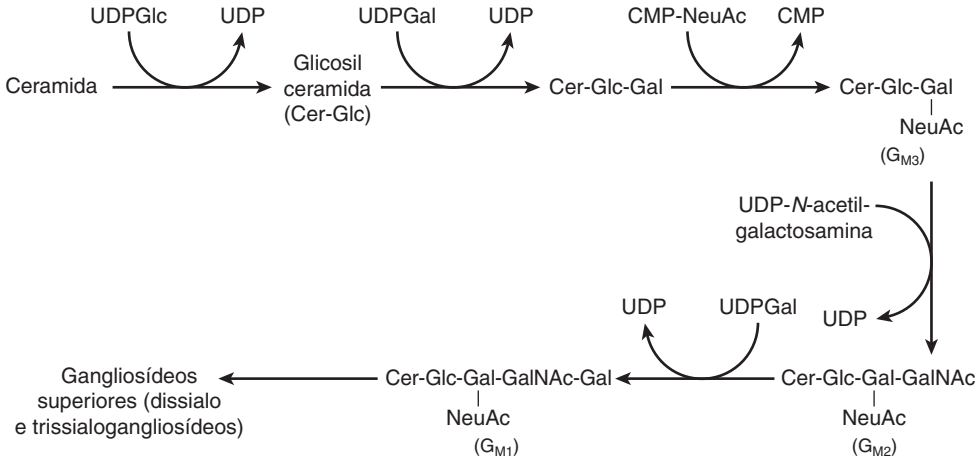


FIGURA 24-9 Biossíntese da gangliosídeos. (NeuAc, ácido *N*-acetilneuramínico.)

TABELA 24-1 Exemplos de esfingolipidoses

Doença	Deficiência enzimática	Lipídeo que se acumula	Sintomas clínicos
Doença de Tay-Sachs	Hexosaminidase A	Cer−Glc−Gal(NeuAc)÷GalNAc G_{M2} Gangliosídeo	Retardo mental, cegueira, fraqueza muscular
Doença de Fabry	α-Galactosidase	Cer−Glc−Gal−÷Gal Globotriaosilceramida	Erupção cutânea, insuficiência renal (os sintomas integrais são observados apenas em indivíduos do sexo masculino; herança recessiva ligada ao X)
Leucodistrofia metacromática	Arilsulfatase A	Cer−Gal−÷OSO_3 3-Sulfogalactosilceramida	Retardo mental e transtornos psicológicos em adultos; desmielinização
Doença de Krabbe	β-Galactosidase	Cer−÷Gal Galactosilceramida	Retardo mental, mielina quase ausente
Doença de Gaucher	β-Glicosidase	Cer−÷Glc Glicosilceramida	Aumento do fígado e do baço, erosão de ossos longos, retardo mental em lactentes
Doença de Niemann-Pick	Esfingomielinase	Cer−÷P−colina Esfingomielina	Aumento do fígado e do baço, retardo mental; fatal no início da vida
Doença de Farber	Ceramidase	Acil−÷esfingosina Ceramida	Rouquidão, dermatite, deformação do esqueleto, retardo mental; fatal no início da vida

Abreviaturas: Cer, ceramida; Gal, galactose; Glc, glicose; NeuAc, ácido *N*-acetilneuramínico; ÷, local de reação da enzima deficiente.

plo, as substâncias do grupo sanguíneo ABO. Certos gangliosídeos atuam como receptores de toxinas bacterianas (p. ex., para a **toxina do cólera**, que subsequentemente ativa a adenilil-ciclase).

ASPECTOS CLÍNICOS

A deficiência de surfactante pulmonar causa a síndrome de angústia respiratória

O **surfactante pulmonar**, constituído principalmente de lipídeo com algumas proteínas e carboidratos, impede o colapso dos alvéolos. O **fosfolipídeo-dipalmitoil-fosfatidilcolina** diminui a tensão superficial na interface entre ar e líquido e, portanto, reduz acentuadamente o trabalho da respiração, porém outros componentes lipídicos e proteicos do surfactante também são importantes na sua função. A deficiência de surfactante pulmonar nos pulmões de muitos recém-nascidos prematuros dá origem à **síndrome de angústia respiratória do recém-nascido** (**SARRN**). A administração de surfactante natural ou artificial tem benefício terapêutico.

Os fosfolipídeos e os esfingolipídeos estão envolvidos na esclerose múltipla e nas lipidoses

Certas doenças caracterizam-se por quantidades anormais desses lipídeos nos tecidos, frequentemente no tecido nervoso. Podem ser classificadas em dois grupos: (1) doenças desmielinizantes verdadeiras e (2) esfingolipidoses.

Na **esclerose múltipla**, uma doença desmielinizante, ocorre perda de fosfolipídeos (particularmente plasmalogênio etanolamina) e de esfingolipídeos da substância branca. Por conseguinte, a composição lipídica da substância branca assemelha-se àquela da substância cinzenta. O líquido cerebrospinal apresenta níveis elevados de fosfolipídeos.

As **esfingolipidoses** (**doenças de depósito de lipídeos**) compreendem um grupo de doenças hereditárias causadas por um defeito genético no catabolismo dos lipídeos contendo esfingosina. As esfingolipidoses fazem parte de um grupo maior de distúrbios dos lisossomos e exibem várias características constantes: (1) ocorre acúmulo de lipídeos complexos contendo ceramida nas células, particularmente nos neurônios, causando neurodegeneração e redução do tempo de sobrevida. (2) A velocidade de **síntese** do lipídeo armazenado é normal. (3) O defeito enzimático está localizado na **via de degradação lisossômica** dos esfingolipídeos. (4) O grau de redução da atividade da enzima afetada é semelhante em todos os tecidos. Não existe nenhum tratamento efetivo para muitas das doenças, embora se tenha obtido algum sucesso com a **terapia de reposição enzimática e transplante de medula óssea** no tratamento da doença de Gaucher e da doença de Fabry. Outras abordagens promissoras são a **terapia de privação de substrato**, para inibir a síntese de esfingolipídeos, e a **terapia com chaperona química**. Na atualidade, a **terapia gênica** para os distúrbios lisossômicos também está em fase de pesquisa. A **Tabela 24-1** fornece alguns exemplos das doenças mais importantes de depósito de lipídeos.

A **deficiência múltipla de sulfatases** resulta em acúmulo de sulfogalactosilceramida, sulfatos esteroides e proteoglicanos, devido à deficiência combinada das arilsulfatases A, B e C e esteroide sulfatase.

RESUMO

- Os triacilgliceróis constituem os principais lipídeos de armazenamento de energia, enquanto os fosfogliceróis, a esfingomielina e os glicoesfingolipídeos são anfipáticos e

desempenham funções estruturais nas membranas celulares, além de outros papéis especializados.

- Os triacilgliceróis e alguns fosfogliceróis são sintetizados por acilação progressiva do glicerol-3-fosfato. A via bifurca no fosfatidato, formando fosfolipídeos inositóis e cardiolipina, por um lado, e triacilglicerol e fosfolipídeos de colina e etalonamina, do outro.
- Os plasmalogênios e o fator de ativação das plaquetas (PAF) são éter fosfolipídeos formados a partir da di-hidroxiacetona-fosfato.
- Os esfingolipídeos são formados a partir da ceramida (*N*-acilesfingosina). A esfingomielina está presente nas membranas das organelas envolvidas nos processos secretores (p. ex., aparelho de Golgi). Os glicoesfingolipídeos mais simples são uma combinação de ceramida mais um resíduo de açúcar (p. ex., GalCer na mielina). Os gangliosídeos são glicoesfingolipídeos mais complexos, que contêm mais resíduos de açúcar e ácido siálico. São encontrados na camada externa da membrana plasmática, onde contribuem para o glicocálix, e são importantes como antígenos e receptores celulares.
- Os fosfolipídeos e os esfingolipídeos estão envolvidos em vários processos mórbidos, incluindo a síndrome de angústia respiratória do recém-nascido (ausência de surfactante pulmonar), a esclerose múltipla (desmielinização) e as esfingolipidoses (incapacidade de degradar os esfingolipídeos nos lisossomos, devido a defeitos hereditários das enzimas hidrolases).

REFERÊNCIAS

McPhail LC: Glycerolipid in signal transduction. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 4th ed. Vance DE, Vance JE (editors). Elsevier, 2002:315–340.

Merrill AH: Sphingolipids. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th ed. Vance DE, Vance JE (editors). Elsevier, 2008:363–398.

Meyer KC, Zimmerman JJ: Infl ammation and surfactant. Paediatr Respir Rev 2002;3:308.

Prescott SM, Zimmerman GA, Staff orini DM, et al: Platelet-activating factor and related lipid mediators. Annu Rev Biochem 2000;69:419.

Ruvolo PP: Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. Pharmacol Res 2003;47:383.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill, 2001.

Vance DE, Vance JE (editors): Phospholipid biosynthesis in eukaryotes. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th ed. Elsevier, 2008: 213–244.

van Echten G, Sandhoff K: Ganglioside metabolism. Enzymology, topology, and regulation. J Biol Chem 1993;268:5341.

CAPÍTULO 25

Transporte e Armazenamento de Lipídeos

Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e
Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Identificar os quatro principais grupos de lipoproteínas plasmáticas e as quatro principais classes de lipídeos que eles transportam.
- Ilustrar a estrutura de uma partícula de lipoproteína.
- Indicar os principais tipos de apolipoproteínas encontradas nas diferentes classes de lipoproteínas.
- Explicar que o triacilglicerol é transportado a partir do intestino (após a sua ingestão na dieta) para o fígado nos quilomícrons e do fígado até os tecidos extra-hepáticos nas lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), e que essas partículas são sintetizadas por processos semelhantes nas células intestinais e hepáticas, respectivamente.
- Ilustrar os processos pelos quais os quilomícrons são metabolizados por lipases para formar remanescentes de quilomícrons, que são então removidos da circulação pelo fígado.
- Explicar como a VLDL é metabolizada por lipases a remanescentes de VLDL (também denominados lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), que podem ser depurados pelo fígado ou convertidos em lipoproteína de baixa densidade (LDL), que atua no transporte do colesterol do fígado para os tecidos extra-hepáticos e que é captada pelo receptor de LDL (apoB100,E).
- Explicar como a lipoproteína de alta densidade (HDL), que transporta o colesterol dos tecidos extra-hepáticos de volta ao fígado no transporte reverso do colesterol, é sintetizada; indicar os mecanismos pelos quais a HDL aceita o colesterol dos tecidos e mostrar como ela é metabolizada no ciclo da HDL.
- Compreender como o fígado desempenha um papel central no transporte e no metabolismo dos lipídeos e como a secreção de VLDL hepática é regulada pela dieta e por hormônios.
- Reconhecer os papéis da LDL e da HDL na promoção e no retardo, respectivamente, do desenvolvimento da aterosclerose.
- Indicar as causas das esteatoses hepática alcoólica e não alcoólica.
- Reconhecer o tecido adiposo como o principal local de armazenamento de triacilglicerol no corpo e explicar os processos pelos quais os ácidos graxos são liberados e como são regulados.
- Compreender o papel do tecido adiposo marrom na produção de calor corporal.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A gordura absorvida a partir da dieta e os lipídeos sintetizados pelo fígado e pelo tecido adiposo devem ser transportados entre os vários tecidos e órgãos para a sua utilização e armazenamento.

Em um onívoro, como o ser humano, as calorias em excesso são ingeridas na fase anabólica do ciclo alimentar, seguida de um período de balanço calórico negativo, quando o organismo recorre às suas reservas de carboidratos e gordura. Os lipídeos são mobilizados do tecido adiposo na forma de ácidos graxos livres (AGL) ligados à albumina sérica. A ocorrência de anormalidades no metabolismo das lipoproteínas provoca várias **hipo** ou **hiperlipoproteinemias**. A mais comum delas é o **diabetes melito**, em que a deficiência de insulina causa mobilização excessiva de AGL e utilização deficiente de quilomícrons e VLDL, com consequente desenvolvimento de **hipertriacilglicerolemia**. As outras condições patológicas que afetam o transporte dos lipídeos são, em sua maioria, causadas principalmente por defeitos hereditários, alguns dos quais provocam **hipercolesterolemia** e **aterosclerose** prematura (Tabela 26-1). A **obesidade** – particularmente a obesidade abdominal – constitui um fator de risco para aumento da mortalidade, da hipertensão arterial, do diabetes melito tipo 2, da hiperlipidemia, da hiperglicemia e várias disfunções endócrinas.

OS LIPÍDEOS SÃO TRANSPORTADOS NO PLASMA SOB A FORMA DE LIPOPROTEÍNAS

As quatro principais classes de lipídeos estão presentes nas lipoproteínas

e em uma fração muito menor de ácidos graxos de cadeia longa não esterificados (ácidos graxos livres ou AGL) (4%). Essa última fração, os

Foram identificados quatro grandes grupos de lipoproteínas plasmáticas

(**Tabela 25-1**). Foram identificados quatro grupos principais de lipoproteínas, importantes tanto fisiologicamente quanto no diagnóstico clínico. Esses quatro grupos consistem em provenientes da absorção intestinal de triacilglicerol e de outros lipídeos.

TABELA 25-1 Composição das lipoproteínas no plasma humano

Lipoproteína	Fonte	Diâmetro (nm)	Densidade (g/mL)	Composição		Principais componentes lipídicos	Apolipoproteínas
				Proteína (%)	Lipídeo (%)		
Quilomícrons	Intestino	90 a 1.000	< 0,95	1 a 2	98 a 99	Triacilglicerol	A-I, A-II, A-IV[1], B-48, C-I, C-II, C-III, E
Remanescentes de quilomícrons	Quilomícrons	45 a 150	< 1,006	6 a 8	92 a 94	Triacilglicerol, fosfolipídeos, colesterol	B-48, E
VLDL	Fígado (intestino)	30 a 90	0,95 a 1,006	7 a 10	90 a 93	Triacilglicerol	B-100, C-I, C-II, C-III
IDL	VLDL	25 a 35	1,006 a 1,019	11	89	Triacilglicerol, colesterol	B-100, E
LDL	VLDL	20 a 25	1,019 a 1,063	21	79	Colesterol	B-100
HDL	Fígado, intestino, VLDL, quilomícrons					Fosfolipídeos, colesterol	A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III, D[2], E
HDL_1		20 a 25	1,019 a 1,063	32	68		
HDL_2		10 a 20	1,063 a 1,125	33	67		
HDL_3		5 a 10	1,125 a 1,210	57	43		
Pré β-HDL_3		< 5	> 1,210				A-I
Albumina/ácidos graxos livres	Tecido adiposo		> 1,281	99	1	Ácidos graxos livres	

[1] Secretada com quilomícrons, porém transferida para a HDL.
[2] Associada às subfrações de HDL_2 e HDL_3.
[3] Parte de uma fração menor, conhecida como lipoproteína de densidade muito alta (ver VHDL)
Abreviaturas: HDL, lipoproteínas de alta densidade: IDL, lipoproteínas de densidade intermediária; LDL, lipoproteínas de baixa densidade; VLDL, lipoproteínas de densidade muito baixa.

e

. O triacilglicerol constitui o lipídeo predominante presente nos quilomícrons e nas VLDL, enquanto o colesterol e os fosfolipídeos são os lipídeos predominantes encontrados nas LDL e HDL, respectivamente (Tabela 25-1). As lipoproteínas podem ser separadas de acordo com suas propriedades eletroforéticas em **α-, β**- e **pré-β-lipoproteínas**.

, circundado por **uma única camada superficial** de moléculas de (**Figura 25-1**).

(Capítulo 15).

A lipoproteína é caracterizada pela distribuição das apolipoproteínas

Verifica-se a presença de uma ou mais apolipoproteínas (proteínas ou polipeptídeos) em cada lipoproteína.

(Tabela 25-1)

que também é encontrada

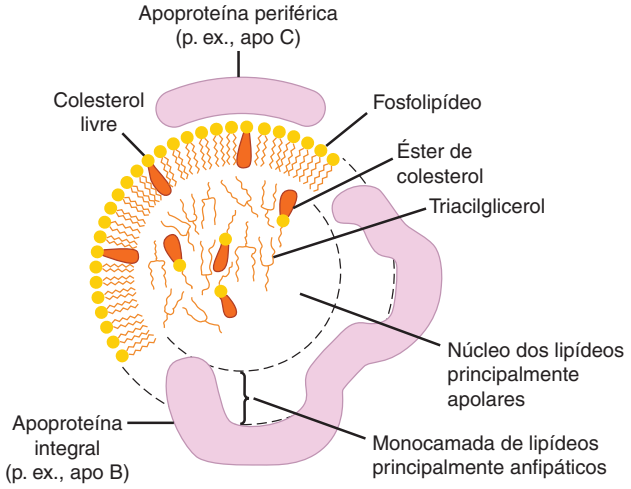


FIGURA 25-1 Estrutura geral de uma lipoproteína plasmática. Convém observar as semelhanças com a estrutura da membrana plasmática. São encontradas pequenas quantidades de éster de colesterol e de triacilglicerol na camada superficial, bem como uma pequena quantidade de colesterol livre no núcleo.

nas VLDL. Os quilomícrons contêm uma forma truncada de apo B (B-48), que é sintetizada no intestino, enquanto a B-100 é sintetizada no fígado. A apo B-100 é uma das cadeias polipeptídicas simples mais longas conhecidas, com 4.536 aminoácidos e massa molecular de 550.000 Da. A apo B-48 (48% da B-100) é formada após transcrição do gene da apo B-100 pela introdução de um sinal de interrupção na transcrição do mRNA por uma enzima de edição do RNA.

nos indivíduos normais, responde por 5 a 10% das apolipoproteínas totais das

Todavia, as funções da apo A-IV e da apo D ainda não estão claramente definidas, porém acredita-se que a apo D seja um importante fator nos distúrbios neurodegenerativos humanos.

OS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES SÃO RAPIDAMENTE METABOLIZADOS

. São , um solubilizador muito efetivo, em concentrações plasmáticas que variam entre 0,1 e 2,0 μeq/mL. Os níveis são baixos no estado alimentado, e aumentam para 0,7 a 0,8 μeq/mL no jejum prolongado. No **diabetes melito** não controlado, os níveis podem alcançar até 2 μeq/mL.

A captação de AGL pelos tecidos está diretamente relacionada à concentração plasmática desses ácidos que, por sua vez, é determinada pela taxa de lipólise no tecido adiposo.

Ao entrarem no citosol, os AGL se ligam às

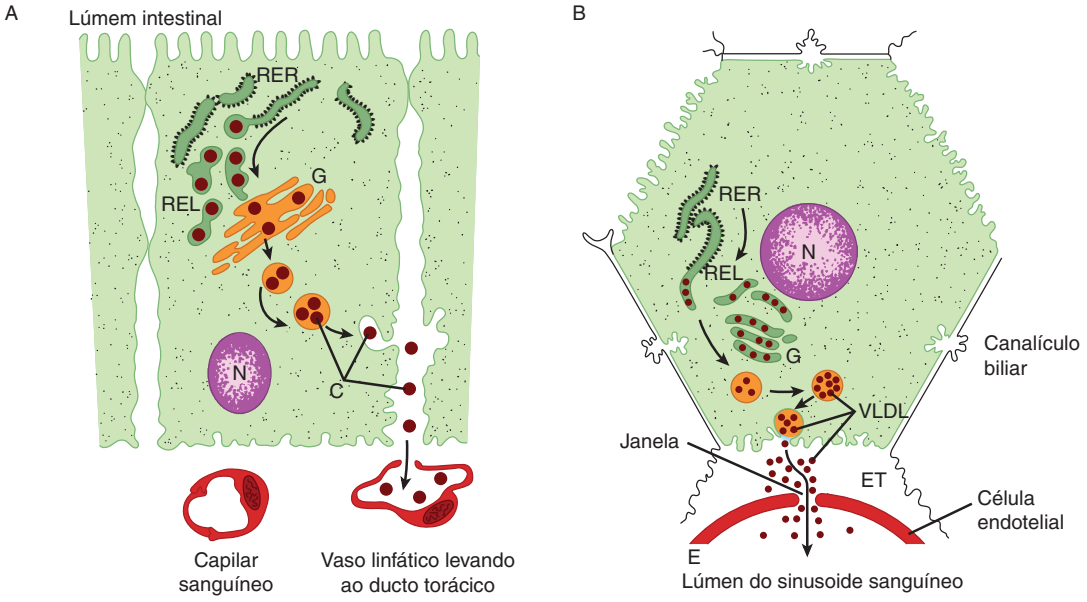


FIGURA 25-2 A formação e a secreção (A) de quilomícrons por uma célula intestinal e (B) de lipoproteínas de densidade muito baixa por uma célula hepática. (C, quilomícrons; E, endotélio; G, aparelho de Golgi; N, núcleo; RER, retículo endoplasmático rugoso; ED, espaço de Disse, que contém plasma sanguíneo; REL, retículo endoplasmático liso; VLDL, lipoproteínas de densidade muito baixa.) A apo lipoproteína B, sintetizada no RER, é incorporada em partículas com triacilglicerol, colesterol e fosfolipídeos no REL. Após a adição de resíduos de carboidratos no G, são liberadas da célula por pinocitose reversa. Os quilomícrons passam para o sistema linfático. As VLDL são secretadas no espaço de Disse e, em seguida, nos sinusoides hepáticos através de janelas no revestimento endotelial.

Acredita-se que o papel dessas proteínas no transporte intracelular seja semelhante ao da albumina sérica no transporte extracelular de ácidos graxos de cadeia longa.

O TRIACILGLICEROL É TRANSPORTADO A PARTIR DO INTESTINO EM QUILOMÍCRONS E A PARTIR DO FÍGADO EM LIPOPROTEÍNAS DE DENSIDADE MUITO BAIXA

São responsáveis pelo transporte de todos os lipídeos dietéticos na circulação. **Elas constituem os veículos de transporte de triacilglicerol do fígado para os tecidos extra-hepáticos.** Os quilomícrons e as VLDL recém-secretadas ou "nascentes" contêm apenas uma pequena (**Figuras 25-3 e 25-4**).

Uma discussão mais detalhada dos fatores que controlam a secreção hepática das VLDL é apresentada a seguir.

OS QUILOMÍCRONS E AS LIPOPROTEÍNAS DE DENSIDADE MUITO BAIXA SÃO RAPIDAMENTE CATABOLIZADAS

A depuração dos quilomícrons do sangue é rápida, Os ácidos graxos que se originam dos triacilgliceróis dos quilomícrons , por conseguinte, os ácidos graxos no fígado devem ser secundários a seu metabolismo nos tecidos extra-hepáticos.

Os triacilgliceróis dos quilomícrons e das VLDL são hidrolisados pela lipase lipoproteica

A lipase lipoproteica

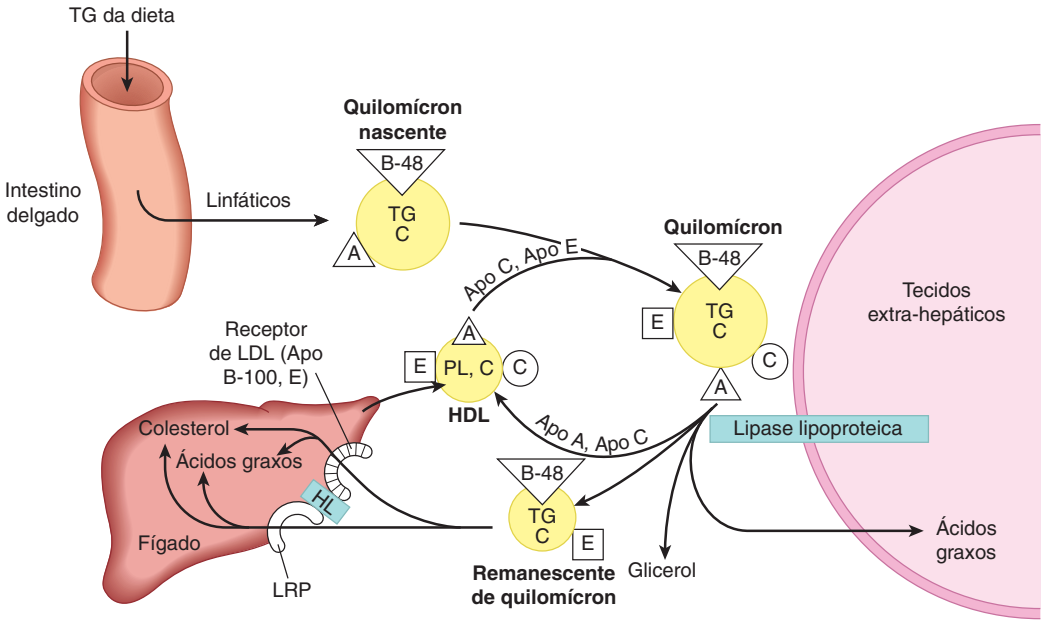


FIGURA 25-3 Destino metabólico dos quilomícrons. (A, apolipoproteína A; B-48, apolipoproteína B-48: C, apolipoproteína C; C, colesterol e éster de colesterol; E, apolipoproteína E; HDL, lipoproteína de alta densidade; LH, lipase hepática; LRP, proteína relacionada com receptor de LDL; PL, fosfolipídeo; TG, triacilglicerol.) São mostrados apenas os lipídeos predominantes.

tem sido encontrada no de ligação do heparan sulfato. Não é normalmente encontrada no sangue; entretanto, após a injeção de **heparina**, a lipase lipoproteica é liberada na circulação a partir de seus sítios

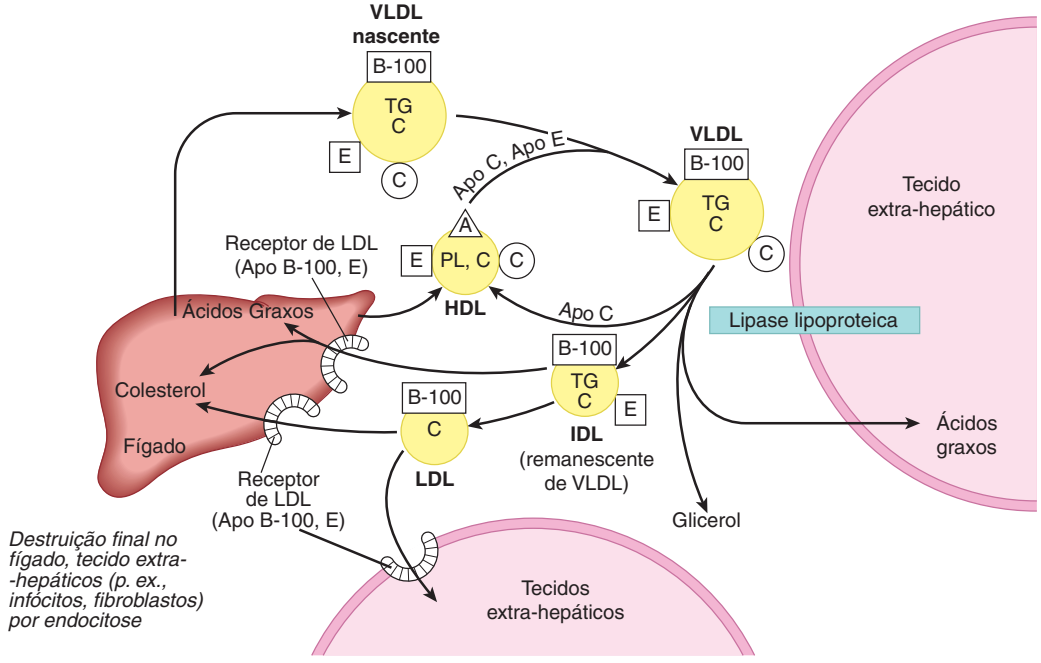


FIGURA 25-4 Destino metabólico das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e produção de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). (A, apolipoproteína A; B-100, apolipoproteína B-100; C, apolipoproteína C; C, colesterol e éster de colesterol; E, apolipoproteína E; HDL, lipoproteína de alta densidade; IDL, lipoproteína de densidade intermediária; PL, fosfolipídeo; TG, triacilglicerol.) São mostrados apenas os lipídeos predominantes. É possível que alguma IDL também seja metabolizada pela proteína relacionada com o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP).

. Ocorre hidrólise enquanto as lipoproteínas estão ligadas à enzima sobre o endotélio. O triacilglicerol é hidrolisado progressivamente por um diacilglicerol a um monoacilglicerol e, por fim, a AGL mais glicerol (Figuras 25-3 e 25-4). A lipase lipoproteica cardíaca apresenta um que corresponde a cerca de um décimo daquele para a enzima presente no tecido adiposo. . Ocorre um redirecionamento semelhante para a glândula mamária durante a lactação, possibilitando a captação de ácidos graxos dos triacilgliceróis das lipoproteínas para a síntese de **gordura do leite**. O **receptor de VLDL** desempenha um importante papel na transferência de ácidos graxos do triacilglicerol das VLDL para os adipócitos, uma vez que se liga às VLDL e as mantém em estreito contato com a lipase lipoproteica.

A ação da lipase lipoproteica forma os remanescentes de lipoproteínas

(Figura 25-3). [ ]) (Figura 25-4).

O fígado é responsável pela captação de remanescentes de lipoproteínas

(**proteína relacionada com o receptor de LDL**). . Apenas uma molécula de apo B-100 está presente em cada uma dessas partículas de lipoproteína, sendo essa característica conservada durante as transformações. (Figura 25-4).

A LDL É METABOLIZADA PELO RECEPTOR DE LDL

Esse receptor é assim designado por ser específico da apo B-100, mas não da B-48, que carece do domínio carboxiterminal da B-100 contendo o ligante do receptor de LDL, e também capta lipoproteínas ricas em apo E. Existe uma correlação positiva entre a incidência de **aterosclerose** e a concentração plasmática de colesterol LDL. O receptor de LDL (apo B-100, E) está deficiente na **hipercolesterolemia familiar**, distúrbio genético caracterizado por níveis sanguíneos elevados de colesterol LDL, causando aterosclerose prematura (Tabela 26-1). Para uma discussão mais detalhada da regulação do receptor de LDL, ver o Capítulo 26.

A HDL PARTICIPA NO METABOLISMO DO TRIACILGLICEROL DAS LIPOPROTEÍNAS E DO COLESTEROL

. Uma importante função das HDL consiste em necessárias no metabolismo dos quilomícrons e das VLDL. . Essas lipoproteínas assemelham-se às partículas encontradas no plasma de pacientes com uma deficiência da enzima plasmática , bem como no plasma de pacientes com **icterícia obstrutiva**. A LCAT – e o ativador da LCAT, a apo A-I – liga-se às partículas discoides, e o fosfolipídeo de superfície e colesterol livre são convertidos em ésteres de colesterol e lisolecitina (Capítulo 24). Os ésteres de colesterol apolares deslocam-se para o interior hidrofóbico da dupla camada, enquanto a lisolecitina é transferida para a albumina plasmática. . Isso ajuda a remover o excesso de colesterol não esterificado das lipoproteínas e dos tecidos, conforme descrito adiante. . No fígado e nos tecidos esteroidogênicos, esse receptor se liga à HDL pela apo A-I, e o éster de colesterol é seletivamente liberado para as células, embora a partícula em si, incluindo a apo A-I, não seja captada. Por outro lado, nos tecidos, o SR-B1 medeia a recepção pela HDL do colesterol proveniente das células e, em seguida, o transporta até o fígado para excreção pela bile (sob a forma de colesterol ou após conversão em ácidos biliares), em um processo conhecido

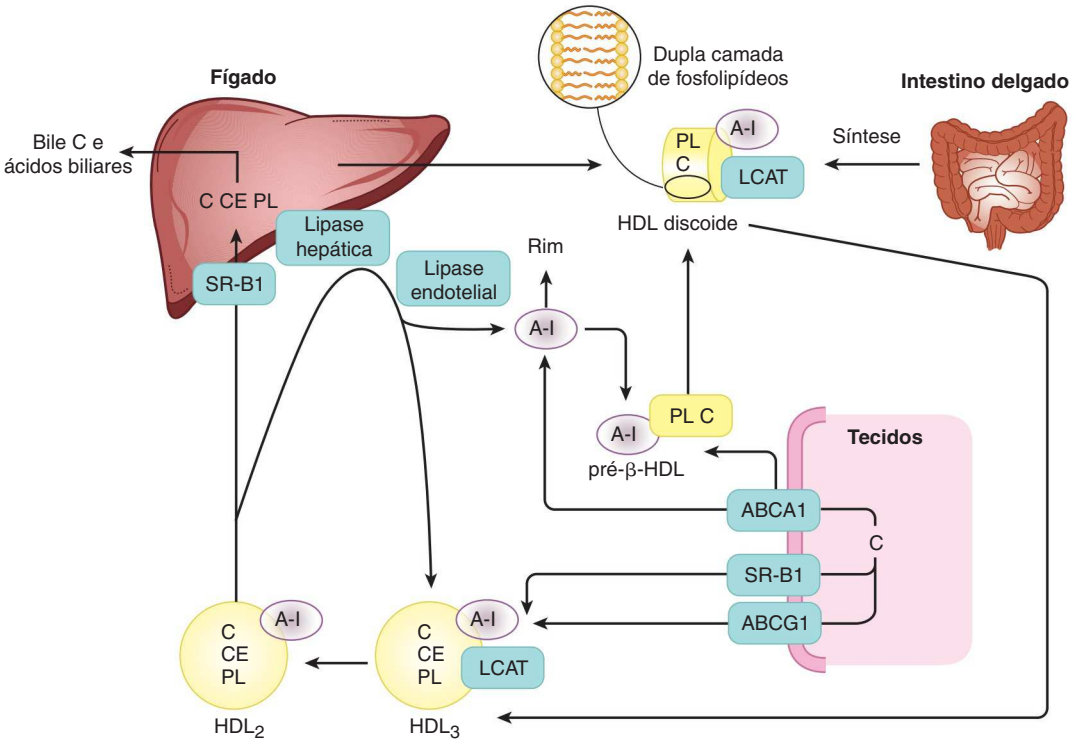


FIGURA 25-5 Metabolismo da lipoproteína de alta densidade (HDL) no transporte reverso do colesterol. (A-I, apolipoproteína A-I; ABCA 1, transportador cassete com ligação de ATP A1; ABCG1, transportador cassete com ligação de ATPG1; C, colesterol; CE, éster de colesterol; LCAT, lecitina: colesterol aciltransferase; PL, fosfolipídeo; SR-B1, receptor *scavenger* B1.) pré-β-HDL, HDL_2, HDL_3 – ver Tabela 25-1. Os constituintes superficiais em excesso, em decorrência da ação da lipase lipoproteica sobre os quilomícrons e as VLDL, constituem outra fonte de pré-β-HDL. A atividade da lipase hepática é aumentada pelos androgênios e diminuída pelos estrogênios, o que pode explicar as concentrações plasmáticas mais elevadas de HDL_2 nas mulheres.

como (Figura 25-5). A apo A-I livre é liberada por esses processos e forma a **pré-β-HDL** após a sua associação a uma quantidade mínima de fosfolipídeo e colesterol. O excesso de apo A-I é destruído no rim. Esses transportadores são membros de uma família de proteínas transportadoras que acoplam a hidrólise do ATP à ligação de um substrato, possibilitando o seu transporte através da membrana. O ABCG1 medeia o transporte do colesterol das células para as HDL, enquanto o ABCA1 promove preferencialmente o efluxo de partículas contendo poucos lipídeos, como a pré-β-HDL ou apo A-1, que são então convertidas em HDL_3 pela HDL discoide (Figura 25-5). A pré-β-HDL constitui a forma mais potente de HDL que induz o efluxo de colesterol dos tecidos.

As concentrações de HDL variam de modo recíproco com as concentrações plasmáticas de triacilglicerol e diretamente com a atividade da lipase lipoproteica. Isso pode ser devido à liberação do excesso de constituintes superficiais, como, por exemplo, fosfolipídeos e apo A-I, durante a hidrólise dos quilomícrons e das VLDL, contribuindo para a formação de pré-β-HDL e HDL discoide. As concentrações de HDL_2 estão **inversamente relacionadas com a incidência de aterosclerose**, possivelmente por refletirem a eficiência do transporte reverso do colesterol. A HDL_c (HDL_1) é encontrada no sangue de animais com hipercolesterolemia induzida por dieta. É rica em colesterol, e a sua única apolipoproteína é a apo E. Aparentemente, todas as lipoproteínas plasmáticas são componentes inter-relacionados de um ou mais ciclos metabólicos que, em seu conjunto, são responsáveis pelo processo complexo de transporte dos lipídeos plasmáticos.

O FÍGADO DESEMPENHA UM PAPEL CENTRAL NO TRANSPORTE E NO METABOLISMO DOS LIPÍDEOS

O fígado desempenha as seguintes funções importantes no metabolismo dos lipídeos:

1. Ele facilita a digestão e a absorção dos lipídeos pela produção de **bile**, que contém colesterol e sais biliares sintetizados no fígado *de novo* ou após a captação do colesterol das lipoproteínas (Capítulo 26).

2.
3. **cetogênese**) (Capítulo 22).
4. (neste capítulo).

A secreção hepática de VLDL está relacionada aos estados nutricional e hormonal

Os eventos celulares envolvidos na formação e na secreção das VLDL já foram descritos (Figura 25-2) e estão ilustrados na **Figura 25-6**. Como o triacilglicerol normalmente não se acumula no fígado nessas condições, deve-se deduzir que ele é transportado a partir do fígado nas VLDL tão rapidamente quanto é sintetizado. Os AGL da circulação constituem a principal fonte durante jejum prolongado, na ingestão de dietas ricas em gordura ou no diabetes melito, quando ocorre inibição da lipogênese hepática. (Figura 25-6). Os fatores que aumentam tanto a síntese de triacilglicerol quanto a secreção de VLDL pelo fígado incluem (1) o estado alimentado, e não o de jejum prolongado; (2) a ingestão de dietas ricas em carboidratos (particularmente quando contêm sacarose ou frutose), resultando em altas taxas de lipogênese e esterificação dos ácidos graxos; (3) níveis elevados de AGL circulantes; (4) ingestão de etanol; e (5) presença de altas concentrações de insulina e baixas concentrações de glucagon, que aumentam a síntese e a esterificação de ácidos graxos e inibem a sua oxidação (Figura 25-6).

ASPECTOS CLÍNICOS

O desequilíbrio nas taxas de formação e exportação de triacilgliceróis provoca esteatose hepática

Por uma variedade de razões, os lipídeos – principalmente na forma de triacilgliceróis – podem acumular-se no fígado (Figura 25-6). O acúmulo extenso é considerado como condição patológica. **A esteatose hepática não alcoólica** (**EHNA**) constitui o distúrbio hepático mais comum no mundo inteiro. Quando o acúmulo de lipídeos no fígado torna-se crônico, pode-se verificar o desenvolvimento de alterações inflamatórias e fibróticas, resultando em **esteato-hepatite não alcoólica** (**EHNA**), que pode evoluir para doenças hepáticas, incluindo **cirrose, hepatocarcinoma e insuficiência hepática**.

O fígado gorduroso é classificado em duas categorias principais. O primeiro tipo está associado a **níveis plasmáticos elevados de ácidos graxos livres**, em decorrência da mobilização de gordura do tecido adiposo ou da hidrólise do triacilglicerol das lipoproteínas pela lipase lipoproteica nos tecidos extra-hepáticos. A produção de VLDL não acompanha o influxo e a esterificação crescentes de ácidos graxos livres, permitindo o acúmulo de triacilglicerol, o que, por sua vez, resulta em fígado gorduroso. Isso ocorre durante o **jejum prolongado** e o consumo de **dietas ricas em gordura**. A capacidade de secretar VLDL também pode estar comprometida (p. ex., no jejum prolongado). No **diabetes melito não controlado**, na **doença de gestação múltipla em ovinos** e na **cetose bovina**, a infiltração gordurosa é grave o suficiente para causar aumento e palidez visível (aparência gordurosa) do fígado, com possível disfunção hepática.

O segundo tipo de fígado gorduroso é, geralmente, devido a um **bloqueio metabólico na produção de lipoproteínas plasmáticas**, possibilitando, assim, o acúmulo de triacilgliceróis. Teoricamente, a lesão pode ser devida a (1) um bloqueio na síntese de apolipoproteínas (ou a um aumento de sua degradação antes que possa ser incorporado nas VLDL), (2) um bloqueio na síntese da lipoproteína a partir dos lipídeos e apolipoproteínas, (3) uma falha no suprimento de fosfolipídeos encontrados nas lipoproteínas, ou (4) uma falha no próprio mecanismo secretor.

Um tipo de esteatose hepática que foi extensamente estudado em ratos é causado por uma deficiência de **colina**, motivo pelo qual foi designada como **fator lipotrópico**. O antibiótico puromicina, a etionina (ácido α-amino-γ-mercaptobutírico), o tetracloreto de carbono, o clorofórmio, o fósforo, o chumbo e o arsênico provocam esteatose hepática e acentuada redução da concentração sanguínea de VLDL em ratos. A colina não protege o organismo contra esses agentes, mas parece auxiliar na recuperação. A ação do tetracloreto de carbono provavelmente envolve a formação de radicais livres, causando peroxidação dos lipídeos. Alguma proteção contra isso é proporcionada pela ação antioxidante de dietas suplementadas com **vitamina E**. Acredita-se que a ação da etionina seja causada por uma redução na disponibilidade de ATP, devido à substituição da metionina da *S*-adenosilmetionina, sequestrando a adenina disponível e impedindo a síntese de ATP. O **ácido orótico** também provoca esteatose hepática; acredita-se que ele interfira na glicolisação das lipoproteínas, inibindo, assim, a sua liberação; além disso, pode comprometer o recrutamento de triacilglicerol para as partículas. A deficiência de vitamina E aumenta a necrose hepática que ocorre na esteatose hepática por deficiência de colina. A adição de vitamina E ou de uma fonte de **selênio** tem efeito protetor ao combater a peroxidação dos lipídeos. Além da deficiência de proteínas, as deficiências de ácidos graxos essenciais e de vitaminas (p. ex., ácido linoleico, piridoxina e ácido pantotênico) podem causar infiltração gordurosa do fígado.

O etanol também provoca esteatose hepática

A **esteatose hepática** alcoólica constitui o primeiro estágio da doença hepática alcoólica (DHA), causada pelo **alcoolismo** e que leva finalmente à **cirrose**. O acúmulo de gordura no fígado é cau-

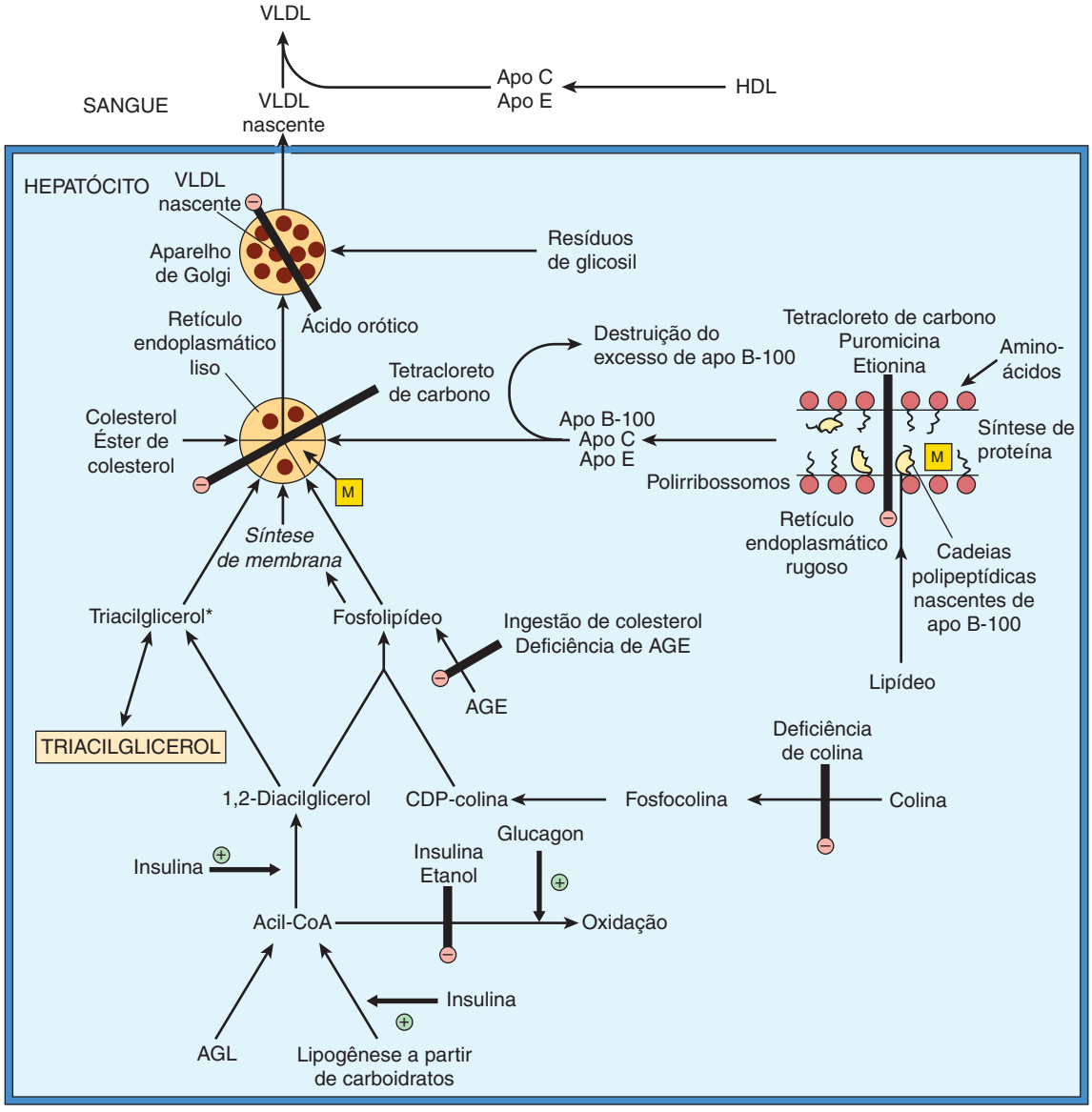
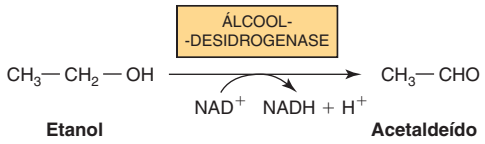
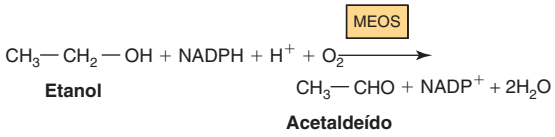


FIGURA 25-6 A síntese da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) no fígado e os possíveis *loci* de ação dos fatores que provocam acúmulo de triacilglicerol e esteatose hepática. (Apo, apolipoproteína; AGE, ácidos graxos essenciais: AGL, ácidos graxos livres; HDL, lipoproteínas de alta densidade; M, proteína microssomal de transferência de triacilglicerol.) As vias indicadas formam uma base para os eventos apresentados na Figura 25-2. O principal reservatório de triacilglicerol no fígado não se encontra na via direta de síntese das VLDL a partir da acil-CoA. Por conseguinte, os AGL, a insulina e o glucagon exercem efeitos imediatos sobre a secreção de VLDL, visto que seus efeitos incidem diretamente no pequeno reservatório* de precursores de triacilglicerol. No estado alimentado, a apo B-100 é sintetizada em quantidades além das necessitadas para a secreção de VLDL, e o excesso é destruído no fígado. Durante a tradução da apo B-100 no retículo endoplasmático rugoso, o transporte de lipídeos mediado pela proteína microssomal de transferência possibilita a associação dos lipídeos com a cadeia polipeptídica nascente. Após a sua liberação dos ribossomos, essas partículas fundem-se com mais lipídeos provenientes do retículo endoplasmático liso, produzindo as VLDL nascentes.

sado por uma combinação de comprometimento da oxidação dos ácidos graxos e aumento da lipogênese, o que se acredita ser devido a alterações do potencial redox de [NADH]/[NAD^+] no fígado, bem como à interferência na ação de fatores de transcrição que regulam a expressão das enzimas envolvidas nas vias. A oxidação de etanol pela **álcool-desidrogenase** resulta em produção excessiva de NADH, que compete com equivalentes redutores de outros substratos, incluindo ácidos graxos, pela cadeia respiratória. Isso inibe a sua oxidação e provoca aumento da esterificação dos ácidos graxos para formar triacilglicerol, resultando em esteatose hepática. A oxidação do etanol leva à formação de acetaldeído, que é oxidado pela **aldeído-desidrogenase**, produzindo acetato. O aumento da razão (NADH)/(NAD^+) também provoca aumento da razão (lactato)/(piruvato), com consequente desenvolvimento de **hiperacidemia lática**, que diminui a excreção de ácido úrico, agravando a **gota**.



Ocorre algum metabolismo do etanol por meio de um sistema microssomal de oxidação do etanol (MEOS) dependente do citocromo P450, envolvendo o NADPH e O_2. A atividade desse sistema aumenta no alcoolismo crônico, podendo responder pelo aumento da depuração metabólica nessa condição. O etanol também inibe o metabolismo de alguns fármacos, como, por exemplo, barbitúricos, ao competir pelas enzimas dependentes do citocromo P450.



Em algumas populações asiáticas e em norte-americanos nativos, o consumo de álcool resulta em reações adversas mais intensas ao acetaldeído, devido a um defeito genético da aldeído desidrogenase mitocondrial.

O TECIDO ADIPOSO CONSTITUI A PRINCIPAL RESERVA DE TRIACILGLICEROL NO CORPO

(**Figura 25-7**). O equilíbrio entre esses dois processos determina a magnitude do reservatório de AGL no tecido adiposo, o que, por sua vez, determina o nível de AGL circulantes no plasma. Como este último exerce efeitos mais profundos sobre o metabolismo de outros tecidos, particularmente o fígado e o músculo, os fatores que operam no tecido adiposo para regular o efluxo de AGL exercem uma influência muito além do próprio tecido.

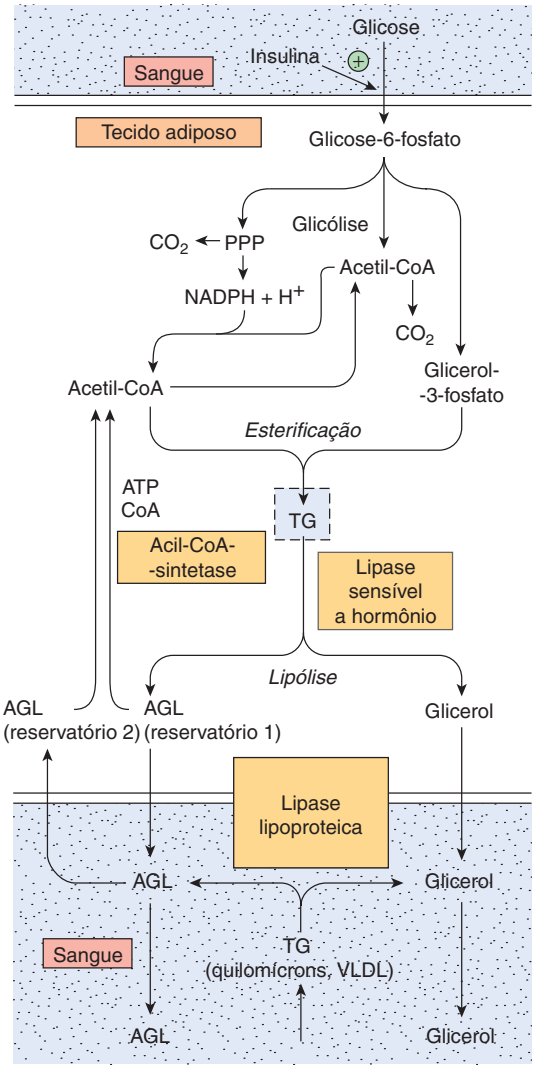


FIGURA 25-7 Metabolismo do triacilglicerol no tecido adiposo. A lipase sensível a hormônio é ativada pelo ACTH, TSH, glucagon, pela epinefrina, norepinefrina e vasopressina e inibida pela insulina, prostaglandina E_1 e pelo ácido nicotínico. Os detalhes da formação do glicerol-3-fosfato a partir de intermediários da glicólise são apresentados na Figura 24-2. (AGL, ácidos graxos livres; PPP, via das pentoses-fosfatos; TG, triacilglicerol; VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa.)

O suprimento de glicerol-3-fosfato regula a esterificação: a lipólise é controlada pela lipase sensível a hormônio

O triacilglicerol é sintetizado a partir de acil-CoA e de glicerol-3-fosfato (Figura 24-2). Como a enzima glicerol-quinase não é expressa no tecido adiposo, o glicerol não pode ser utilizado para suprimento de glicerol-3-fosfato, que deve ser obtido da glicose a partir da glicólise.

O triacilglicerol sofre hidrólise por uma **lipase sensível a hormônio**, com formação de AGL e glicerol. Essa lipase é distinta da lipase lipoproteica, que catalisa a hidrólise do triacilglicerol das lipoproteínas antes de sua captação pelos tecidos extra-hepáticos (ver anteriormente). Como não pode ser utilizado, o glicerol entra no sangue circulante e é captado e transportado para tecidos como o fígado e o rim, que possuem uma glicerol-quinase ativa. Os AGL formados por lipólise podem ser reconvertidos no tecido adiposo em acil-CoA pela **acil-CoA-sintetase** e reesterificados com glicerol-3-fosfato para formar triacilglicerol. Por conseguinte, **existe um ciclo contínuo de lipólise e reesterificação dentro do tecido**. Entretanto, quando a taxa de reesterificação não é suficiente para acompanhar a taxa de lipólise, os AGL acumulam-se e difundem-se no plasma, onde se ligam à albumina e aumentam a concentração plasmática de ácidos graxos livres.

O aumento do metabolismo da glicose reduz o efluxo de AGL

Quando a utilização de glicose pelo tecido adiposo aumenta, o efluxo de AGL diminui. Entretanto, a liberação de glicerol continua,

demonstrando que o efeito da glicose não é mediado pela redução da taxa de lipólise. O efeito deve-se ao suprimento de glicerol-3-fosfato, que aumenta a esterificação dos AGL. A glicose pode seguir diversas vias no tecido adiposo, incluindo a oxidação a CO_2 pelo ciclo do ácido cítrico, a oxidação na via das pentoses-fosfato, a conversão em ácidos graxos de cadeia longa e a formação de acilglicerol pelo glicerol-3-fosfato (Figura 25-7). Quando a utilização da glicose está elevada, uma maior proporção da captação de glicose é oxidada a CO_2 e convertida em ácidos graxos. Entretanto, à medida que a utilização de glicose total diminui, a maior proporção da glicose é direcionada para a formação de glicerol-3-fosfato para a esterificação da acil-CoA, o que ajuda a minimizar o efluxo de AGL.

OS HORMÔNIOS REGULAM A MOBILIZAÇÃO DAS GORDURAS

A lipólise no tecido adiposo é inibida pela insulina

A taxa de liberação de AGL do tecido adiposo é afetada por muitos hormônios que influenciam a taxa de esterificação ou a taxa de lipólise. Todos esses efeitos dependem da presença de glicose e podem ser explicados, em grande parte, com base na capacidade da insulina de aumentar a captação de glicose nas células adiposas por meio do **transportador GLUT 4**. Além disso, a insulina aumenta a atividade das , reforçando os efeitos da captação aumentada de glicose sobre o aumento da síntese de ácidos graxos e acilglicerol. Essas três enzimas são reguladas de modo coordenado por mecanismos de fosforilação-desfosforilação.

O tecido adiposo é muito mais sensível à insulina do que muitos outros tecidos, sendo apontado como importante local de ação da insulina *in vivo*.

Vários hormônios promovem a lipólise

Outros hormônios aceleram a liberação de AGL do tecido adiposo e causam elevação da concentração plasmática de ácidos graxos livres ao aumentar a taxa de lipólise das reservas de triacilglicerol (**Figura 25-8**). Esses hormônios incluem a . Muitos desses hormônios ativam a lipase sensível ao hormônio. Para produzir um efeito ótimo, a maioria desses processos lipolíticos requer a presença de **glicocorticoides** e **hormônios tireoidianos**. Esses hormônios atuam com capacidade **facilitadora** ou **permissiva** no que concerne a outros fatores endócrinos lipolíticos.

Os hormônios que atuam rapidamente na ativação da lipólise, por exemplo, . O mecanismo é análogo àquele responsável pela estimulação hormonal da glicogenólise (Capítulo 19). A **insulina** antagoniza os efeitos dos hormônios lipolíticos. A lipólise parece ser mais sensível a alterações na concentração de insulina do que à utilização e esterificação da glicose. A insulina também estimula a fosfodiesterase e a lipase fosfatase que inativa a lipase sensível a hormônio. O efeito do hormônio do crescimento na promoção da lipólise depende da síntese de proteínas envolvidas na formação de AMPc. Os glicocorticoides promovem a lipólise pela síntese de nova proteína lipase por uma via independente de AMPc, que pode ser inibida pela insulina, bem como pela promoção da transcrição de genes envolvidos na cascata de sinalização do AMPc. Esses achados ajudam a explicar o papel da hipófise e do córtex suprarrenal no aumento da mobilização da gordura. O tecido adiposo secreta hormônios, como a **adiponectina**, que modula o metabolismo da glicose e dos lipídeos no músculo e no fígado, e a **leptina**, que regula a homeostasia da energia. Evidências atuais sugerem que, nos seres humanos, o principal papel da leptina consiste em suprimir o apetite quando a ingestão de alimentos é suficiente. Se a leptina estiver ausente, a ingestão de alimento pode ser descontrolada, causando obesidade.

O sistema nervoso simpático, por meio da liberação de norepinefrina no tecido adiposo, desempenha um papel central na mobilização de AGL. Por conseguinte, o aumento da lipólise causado por muitos dos fatores anteriormente descritos pode ser reduzido ou abolido por desnervação do tecido adiposo ou por bloqueio ganglionar.

A perilipina regula o equilíbrio entre o armazenamento de triacilglicerol e a lipólise nos adipócitos

, a ATP-citrato

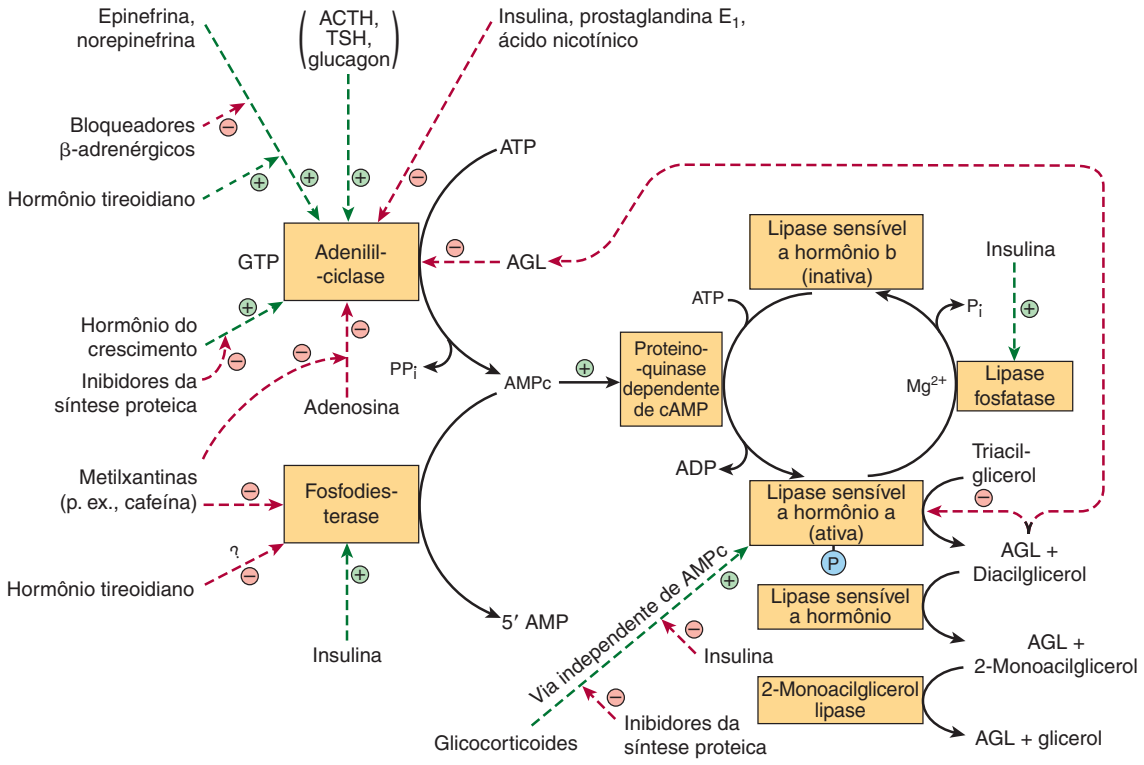


FIGURA 25-8 Controle da lipólise do tecido adiposo. (AGL, ácidos graxos livres; TSH, hormônio estimulante da tireoide.) Observe a sequência da cascata de reações, produzindo uma amplificação em cada etapa. O estímulo lipolítico é "desligado" pela remoção do hormônio estimulante; pela ação da lipase fosfatase; pela inibição da lipase e da adenilil-ciclase por altas concentrações de AGL; pela inibição da adenilil-ciclase pela adenosina; e pela remoção do AMPc em decorrência da ação da fosfodiesterase. O ACTH, o TSH e o glucagon podem não ativar a adenilil-ciclase *in vivo*, visto que a concentração de cada hormônio necessária *in vitro* é muito maior do que aquela encontrada na circulação. Os efeitos reguladores positivos ⊕ e negativos ⊖ são representados por linhas pontilhadas, e o fluxo de substratos, por linhas contínuas.

liase, uma enzima-chave na lipogênese, não parece estar presente, e outras enzimas lipogênicas – por exemplo, a glicose-6-fosfato desidrogenase e a enzima málica – não sofrem alterações adaptativas. Nas aves, a lipogênese é restrita ao fígado, onde é particularmente importante no fornecimento de lipídeos para a formação dos ovos, estimulada pelos estrogênios.

O TECIDO ADIPOSO MARROM PROMOVE A TERMOGÊNESE

O tecido adiposo marrom está envolvido no metabolismo, particularmente nas ocasiões em que há necessidade de geração de calor. Assim, esse tecido é extremamente ativo em algumas espécies, como, por exemplo, no término da hibernação, em animais expostos ao frio (termogênese sem calafrios) e na produção de calor no recém-nascido. É notável observar que o tecido adiposo marrom está reduzido ou ausente nos indivíduos obesos. A ênfase metabólica está na oxidação da glicose e nos ácidos graxos. A **norepinefrina** liberada a partir das terminações nervosas simpáticas é importante para aumentar a lipólise nesse tecido e para aumentar a síntese da lipase lipoproteica, de modo a intensificar a utilização das lipoproteínas ricas em triacilglicerol presentes na circulação. A oxidação e a fosforilação não estão acopladas nas mitocôndrias desse tecido, e a fosforilação que ocorre é observada no nível do substrato, por exemplo, na etapa da succinato-tioquinase e na glicólise. Desse modo, **a oxidação produz muito calor, e pouca energia livre é retida no ATP**. Uma proteína desacopladora termogênica, a **termogenina**, atua como via de condutância de prótons, dissipando o potencial eletroquímico que existe através da membrana mitocondrial (**Figura 25-9**).

RESUMO

- Por serem insolúveis em água, os lipídeos apolares combinam-se, para o seu transporte entre os tecidos no plasma aquoso do sangue, com lipídeos anfipáticos e com proteínas, formando lipoproteínas miscíveis em água.
- São reconhecidos quatro grupos principais de lipoproteínas. Os quilomícrons transportam lipídeos resultantes da digestão

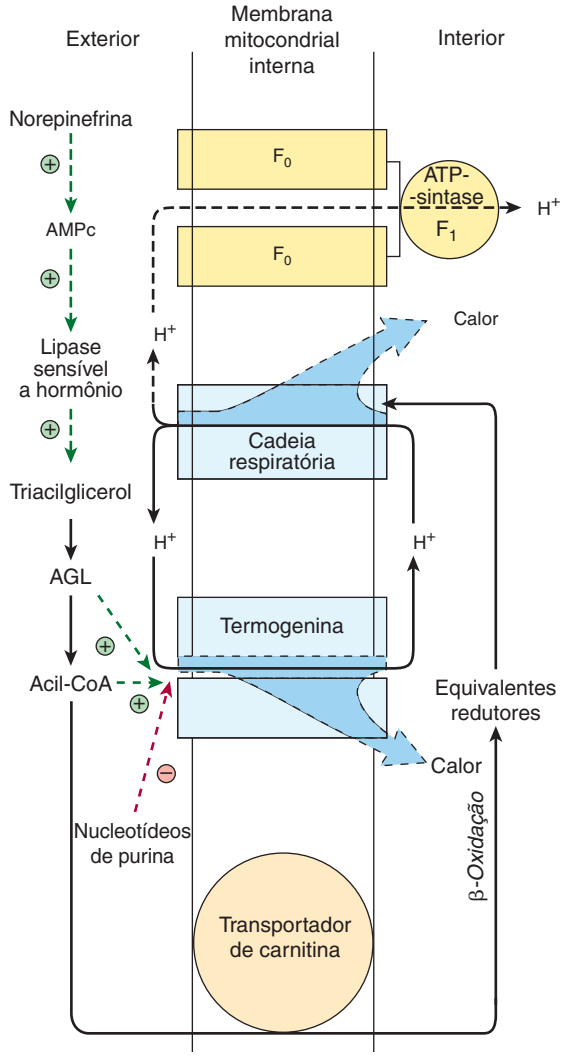


FIGURA 25-9 Termogênese no tecido adiposo marrom. Além da translocação de prótons, a atividade da cadeia respiratória também produz calor (Capítulo 13). Esses prótons dissipam mais calor quando retornam ao compartimento mitocondrial interno através da termogenina, em lugar de passar pela ATP-sintase F_1, a via que gera ATP (Figura 13-7). A passagem de H^+ através da termogenina é inibida por nucleotídeos de purina quando o tecido adiposo marrom não é estimulado. Sob a influência da norepinefrina, a inibição é removida pela produção de ácidos graxos livres (AGL) e acil-CoA. Convém observar o duplo papel da acil-CoA, facilitando a ação da termogenina e suprindo equivalentes redutores para a cadeia respiratória. ⊕ e ⊖ indicam efeitos reguladores positivos e negativos.

e da absorção. As lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) transportam triacilgliceróis provenientes do fígado. As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) liberam colesterol nos tecidos, e as lipoproteínas de alta densidade (HDL) removem o colesterol dos tecidos, devolvendo-o ao fígado para a sua excreção, no processo conhecido como transporte reverso do colesterol.

- Os quilomícrons e as VLDL são metabolizados pela hidrólise de seus triacilgliceróis, e os remanescentes das lipoproteínas são deixados na circulação. Esses remanescentes são captados pelo fígado, porém alguns (LDL), resultantes das VLDL, formam LDL, que é captada pelo fígado e por outros tecidos através do receptor de LDL.
- As apolipoproteínas constituem a fração proteica das lipoproteínas. Atuam como ativadores enzimáticos (p. ex., C-II e apo A-I) ou como ligantes para receptores celulares (p. ex., apo A-I, apo E e apo B-100).
- O triacilglicerol é o principal lipídeo de armazenamento no tecido adiposo. Com a sua mobilização, ocorre liberação de AGL e glicerol. Os AGL constituem uma importante fonte de combustível.
- O tecido adiposo marrom constitui o local da "termogênese sem calafrios". Esse tecido é encontrado em animais que hibernam e em animais recém-nascidos; nos seres humanos, está presente em pequenas quantidades. A termogênese resulta da presença de uma proteína desacopladora, a termogenina, na membrana mitocondrial interna.

REFERÊNCIAS

Arner P: Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2005;19:471.

Brasaemle DL: Th ematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. J Lipid Res 2007;48:2547.

Fielding CJ, Fielding PE: Dynamics of lipoprotein transport in the circulatory system. In *Biochemistry of Lipids*, Lipoproteins and Membranes, 5th ed. Vance DE, Vance JE (editors). Elsevier, 2008;533–554.

Goldberg IJ, Merkel M: Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry and molecular biology. Front Biosci 2001;6:D388.

Kershaw EE, Flier JS: Adipose tissue as an endocrine organ. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:2548.

Lass A, Zimmermann R, Oberer M, et al: Lipolysis—a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. Prog Lipid Res 2011;50:14.

Lenz A, Diamond FB: Obesity: the hormonal milieu. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2008;15:9.

Redgrave TG: Chylomicron metabolism. Biochem Soc Trans 2004;32:79.

Schreuder TC, Verwer BJ, van Nieuwkerk CM, et al: Nonalcoholic fatty liver disease: an overview of current insights in pathogenesis, diagnosis and treatment. World J Gastroenterol 2008;14:2474.

Sell H, Deshaies Y, Richard D: Th e brown adipocyte: update on its metabolic role. Int J Biochem Cell Biol 2004;36:2098.

Vance JE, Adeli K: Assembly and secretion of triacylglycerolrich lipoproteins. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th ed. Vance DE, Vance JE (editors). Elsevier, 2008;507–532

CAPÍTULO

26

Síntese, Transporte e Excreção do Colesterol

Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e
Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Reconhecer a importância do colesterol como componente estrutural essencial das membranas celulares e como precursor de todos os outros esteroides no organismo, e explicar o seu papel patológico na doença dos cálculos biliares de colesterol e no desenvolvimento da aterosclerose.
- Identificar as cinco etapas na biossíntese do colesterol a partir da acetil-CoA.
- Compreender o papel da 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA-redutase (HMG-CoA-redutase) no controle da taxa de síntese do colesterol e explicar os mecanismos pelos quais a sua atividade é regulada.
- Reconhecer que o equilíbrio do colesterol nas células é rigorosamente regulado e indicar os fatores envolvidos na manutenção do equilíbrio correto.
- Explicar o papel das lipoproteínas plasmáticas, incluindo os quilomícrons, a lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e a lipoproteína de alta densidade (HDL), no transporte do colesterol entre os tecidos e o plasma.
- Citar os dois principais ácidos biliares primários encontrados nos mamíferos, descrever de modo sucinto as vias pelas quais são sintetizados a partir do colesterol no fígado e compreender o papel da colesterol 7α-hidroxilase na regulação do processo.
- Reconhecer a importância da síntese de ácidos biliares não apenas na digestão e absorção das gorduras, mas também como importante via de excreção do colesterol.
- Indicar como os ácidos biliares secundários são produzidos a partir dos ácidos biliares primários pelas bactérias intestinais.
- Explicar o que se entende por "circulação entero-hepática" e por que ela é importante.
- Identificar os fatores de estilo de vida que influenciam as concentrações plasmáticas de colesterol e que afetam, portanto, o risco de coronariopatia.
- Compreender que a classe de lipoproteínas na qual o colesterol é transportado é importante na determinação dos efeitos do colesterol plasmático sobre o desenvolvimento da aterosclerose, sendo os níveis elevados de VLDL ou LDL deletérios, enquanto os níveis elevados de HDL são benéficos.
- Citar exemplos de distúrbios hereditários e não hereditários que afetam o metabolismo das lipoproteínas, causando hipo ou hiperlipoproteinemia.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

O **colesterol** está presente nos tecidos e no plasma na forma de colesterol livre ou em combinação com um ácido graxo de cadeia longa, na forma de éster de colesterol, sua forma de armazenamento. No plasma, ambas as formas são transportadas nas lipoproteínas (Capítulo 25). O colesterol é um lipídeo anfipático e, desse modo, um componente estrutural essencial das membranas, onde é importante na manutenção da permeabilidade e fluidez apropriadas, bem como da camada externa das lipoproteínas plasmáticas. É sintetizado em muitos tecidos a partir da acetil-CoA e constitui o precursor de todos os outros esteroides no organismo, incluindo os corticosteroides, os hormônios sexuais, os ácidos biliares e a vitamina D. Como produto típico do metabolismo animal, o colesterol é encontrado nos alimentos de origem animal, como a gema de ovo, a carne, o fígado e o cérebro. A **lipoproteína de baixa densidade** (**LDL**) do plasma é o veículo que fornece o colesterol e o éster de colesterol em muitos tecidos. O colesterol livre é removido dos tecidos pela **lipoproteína de alta densidade** (**HDL**) plasmática e transportado até o fígado, onde é eliminado do organismo em sua forma inalterada ou após conversão em ácidos biliares por um processo conhecido como **transporte reverso do colesterol** (Capítulo 25). O colesterol é um importante constituinte dos **cálculos biliares**. Entretanto, seu principal papel em processos patológicos consiste em atuar como fator na gênese da **aterosclerose** de artérias vitais, causando doença vascular cerebral, coronariana e periférica.

O COLESTEROL PROVÉM DA DIETA E DA BIOSSÍNTESE EM PORCENTAGENS PRATICAMENTE IGUAIS

Pouco mais da metade do colesterol do organismo origina-se por síntese (cerca de 700 mg/dia), enquanto o restante provém da dieta habitual. Nos seres humanos, o fígado e o intestino são responsáveis, cada um, por cerca de 10% da síntese total. Praticamente todos os tecidos que contêm células nucleadas são capazes de efetuar a síntese de colesterol, que ocorre no retículo endoplasmático e nos compartimentos citosólicos.

A acetil-CoA constitui a fonte de todos os átomos de carbono do colesterol

A biossíntese do colesterol pode ser dividida em cinco etapas: (1) síntese do **mevalonato** a partir da acetil-CoA (**Figura 26-1**); (2) formação de **unidades isoprenoides** a partir do mevalonato com a perda de CO_2 (**Figura 26-2**); (3) condensação de seis unidades isoprenoides para formar o **esqualeno** (Figura 26-2); (4) ciclização do esqualeno, dando origem ao esteroide original, o **lanosterol**; (5) formação do colesterol a partir do lanosterol (**Figura 26-3**).

Etapa 1 – Biossíntese do mevalonato: A HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA) é formada nas mitocôndrias pelas reações utilizadas para a síntese dos corpos cetônicos (Figura 22-7). Entretanto, como a síntese do colesterol é extramitocondrial, as duas vias são distintas. Inicialmente, ocorre condensação de duas moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA, em uma reação catalisada pela **tiolase** citosólica. O acetoacetil-CoA condensa-se com outra molécula de acetil-CoA em outra reação catalisada pela **HMG-CoA-sintase**, com formação de HMG-CoA, que é reduzida em **mevalonato** pelo NADPH, em uma reação catalisada pela **HMG-CoA-redutase**. Esta última etapa constitui a principal etapa reguladora na via de síntese do colesterol e o local de ação da classe mais efetiva de agentes redutores do colesterol, as estatinas, que são inibidores da HMG-CoA-redutase (Figura 26-1).

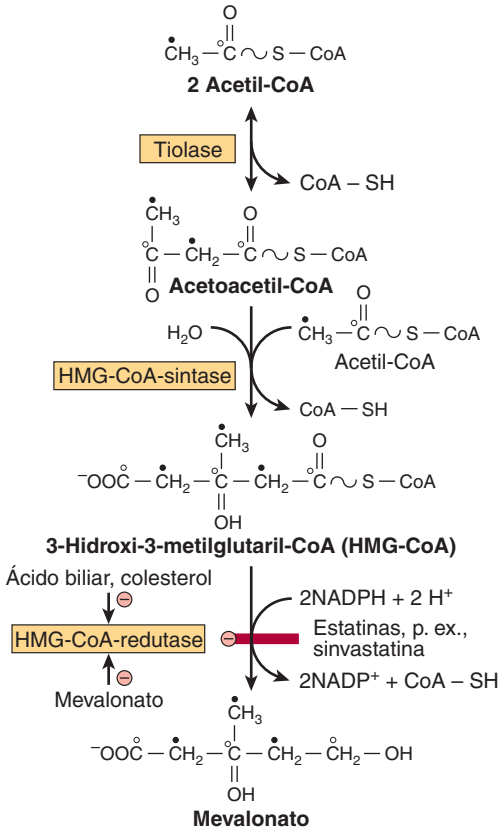


FIGURA 26-1 Biossíntese do mevalonato. A HMG-CoA-redutase é inibida pelas estatinas. Os círculos abertos e fechados indicam o destino de cada um dos carbonos na porção acetil da acetil-CoA.

Etapa 2 – Formação das unidades isoprenoides: O mevalonato é fosforilado sequencialmente por três quinases utilizando o ATP e, após descarboxilação (Figura 26-2), ocorre formação da unidade isoprenoide ativa, o **isopentenil-difosfato**.

Etapa 3 – Formação do esqualeno a partir de seis unidades isoprenoides: O isopentenil-difosfato é isomerizado por um deslocamento da dupla ligação para formar **dimetilalil-difosfato** e, em seguida, condensado com outra molécula de isopentenil-difosfato, com formação do intermediário de dez carbonos, o **geranil-difosfato** (Figura 26-2). Uma condensação adicional com isopentenil difosfato forma o **farnesil-difosfato**. Duas moléculas de farnesil difosfato condensam-se na extremidade difosfato, formando o **esqualeno**. Inicialmente, o pirofosfato inorgânico é eliminado, resultando no pré-esqualeno difosfato, que é então reduzido pelo NADPH, com eliminação de mais uma molécula de pirofosfato inorgânico.

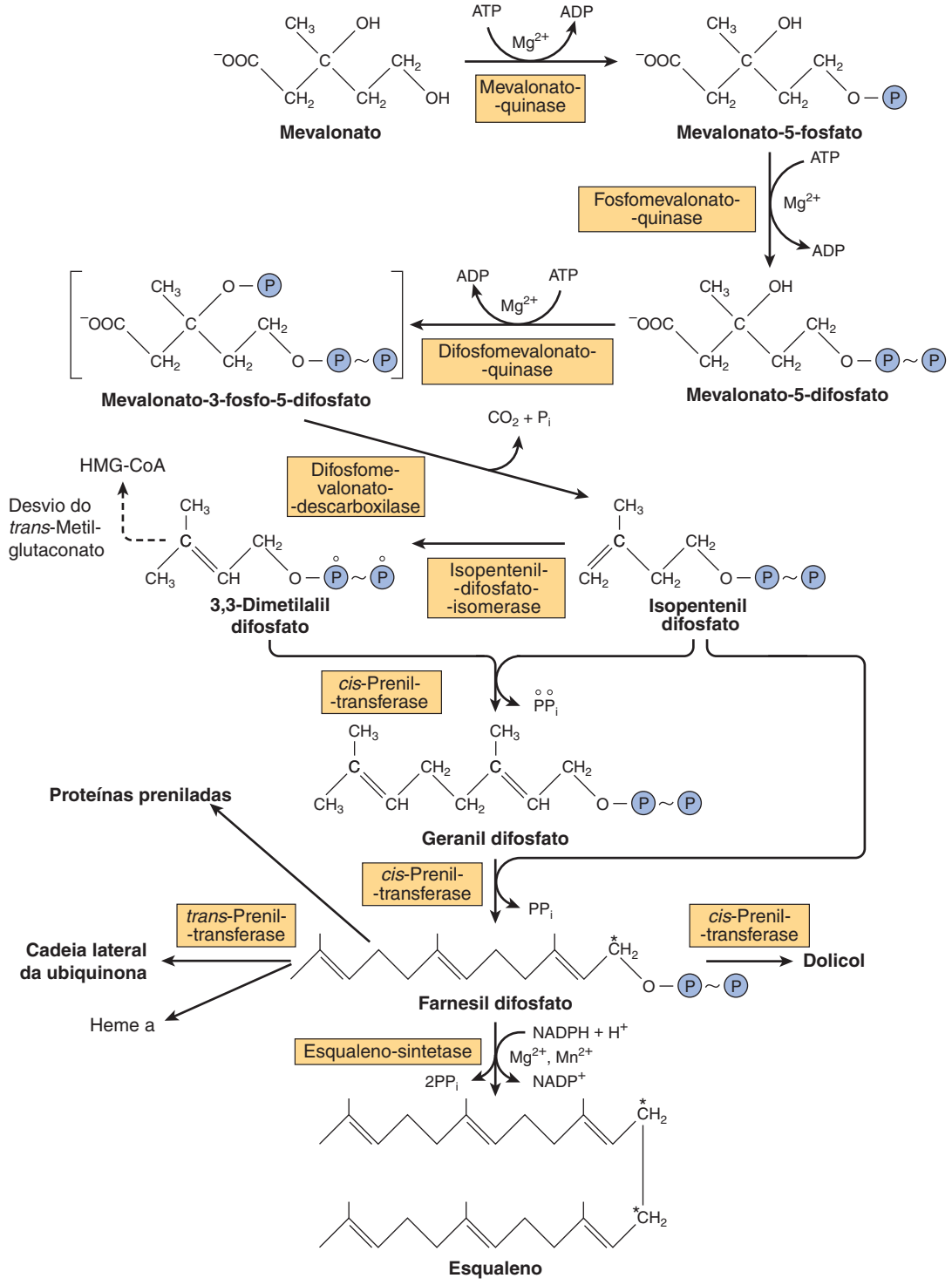


FIGURA 26-2 Biossíntese do esqualeno, da ubiquinona, do dolicol e de outros derivados poli-isoprênicos. (HMG-CoA, 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA.) Existe um resíduo farnesil no heme a da citocromo-oxidase. O carbono marcado com asterisco torna-se o C_{11} ou o C_{12} no esqualeno. A esqualeno-sintetase é uma enzima microssomal; todas as outras enzimas indicadas são proteínas citosólicas solúveis, e algumas são encontradas nos peroxissomos.

Etapa 4 – Formação do lanosterol: O esqualeno pode dobrar-se em uma estrutura que se assemelha estreitamente ao núcleo esteroide (Figura 26-3). Antes do fechamento do anel, o esqualeno é convertido em esqualeno 2,3-epóxido por uma oxidase de função mista presente no retículo endoplasmático, a **esqualeno-epoxidase**. O grupo metila em C_{14} é transferido para o C_{13} e o

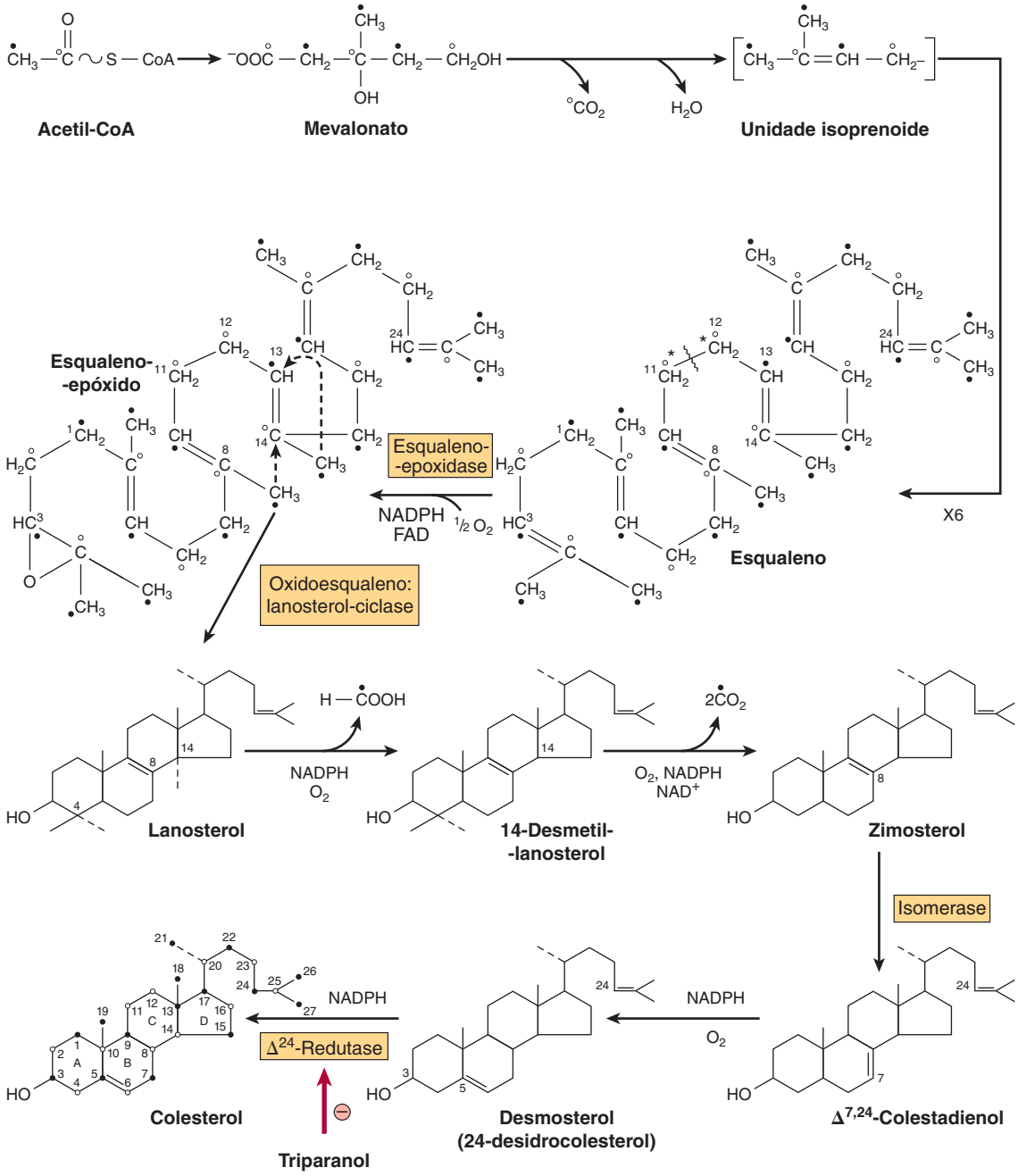


FIGURA 26-3 Biossíntese do colesterol. As posições numeradas correspondem ao núcleo esteroide, enquanto os círculos abertos e fechados indicam o destino de cada um dos carbonos da fração acetil na acetil-CoA. (*Referem-se à numeração do esqualeno da Figura 26-2.)

do C_8 para o C_{14} à medida que ocorre a ciclização, catalisada pela **oxidoesqualeno-lanosterol ciclase**.

Etapa 5 – Formação do colesterol: A formação do colesterol a partir do **lanosterol** ocorre nas membranas do retículo endoplasmático e envolve alterações no núcleo e na cadeia lateral do esteroide (Figura 26-3). Os grupos metila em C_{14} e C_4 são removidos para formar 14-desmetil lanosterol e, em seguida, zimosterol. Posteriormente, a dupla ligação em C_8-C_9 é transferida para C_5-C_6 em duas etapas, com formação do **desmosterol**. Por fim, a dupla ligação da cadeia lateral é reduzida, produzindo colesterol.

O farnesil difosfato dá origem ao dolicol e à ubiquinona

Os poli-isoprenoides **dolicol** (Figura 15-20 e Capítulo 47) e **ubiquinona** (Figura 13-5) são formados a partir do farnesil-difosfato pelo acréscimo adicional de até 16 (dolicol) ou 3 a 7 (ubiquinona) resíduos de isopentenil-difosfato (Figura 26-2). Algumas **proteínas de ligação ao GTP** na membrana celular são preniladas com resíduos de farnesil ou geranilgeranil (20 carbonos). Acredita-se que a **prenilação proteica** facilite a ancoragem das proteínas em

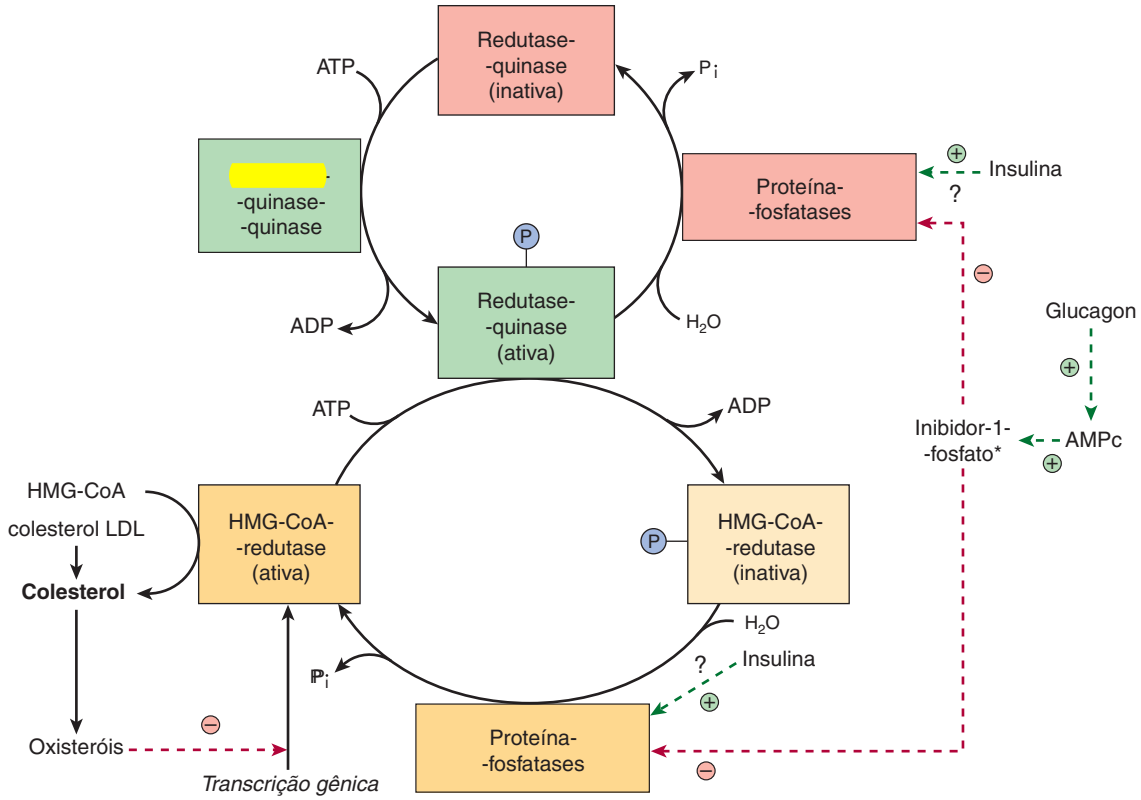


FIGURA 26-4 Possíveis mecanismos envolvidos na regulação da síntese de colesterol pela HMG-CoA-redutase. A insulina desempenha um papel dominante em comparação com o glucagon. (*Ver Figura 19-6.)

membranas lipoides e também possa estar envolvida nas interações entre proteínas e no transporte de proteínas associadas à membrana.

A SÍNTESE DE COLESTEROL É CONTROLADA PELA REGULAÇÃO DA HMG-COA-REDUTASE

. Nos animais em jejum prolongado, a síntese diminuída de colesterol é acompanhada de redução da atividade da enzima. Entretanto, o colesterol da dieta inibe apenas a síntese hepática.

O colesterol e seus metabólitos suprimem a transcrição da HMG-CoA-redutase pela ativação de um fator de transcrição, a . As SREBP constituem uma família de proteínas que regulam a transcrição de uma gama de genes envolvidos na captação e no metabolismo celulares do colesterol e de outros lipídeos.

Além desses mecanismos envolvidos na regulação da taxa de síntese proteica, a atividade enzimática também é modulada mais rapidamente por modificação pós-tradução (**Figura 26-4**).

. A atividade enzimática é reversivelmente modificada pelos mecanismos de fosforilação-desfosforilação, alguns dos quais podem ser dependentes de AMPc e, portanto, imediatamente responsivos ao glucagon. As tentativas de reduzir o colesterol plasmático nos seres humanos ao diminuir a quantidade de colesterol na dieta produzem resultados variáveis. Em geral, uma redução de 100 mg do colesterol dietético produz uma redução de aproximadamente 0,13 mmol/L na concentração sérica.

MUITOS FATORES INFLUENCIAM O EQUILÍBRIO DO COLESTEROL NOS TECIDOS

Nos tecidos, o equilíbrio do colesterol é regulado como descrito a seguir (**Figura 26-5**).

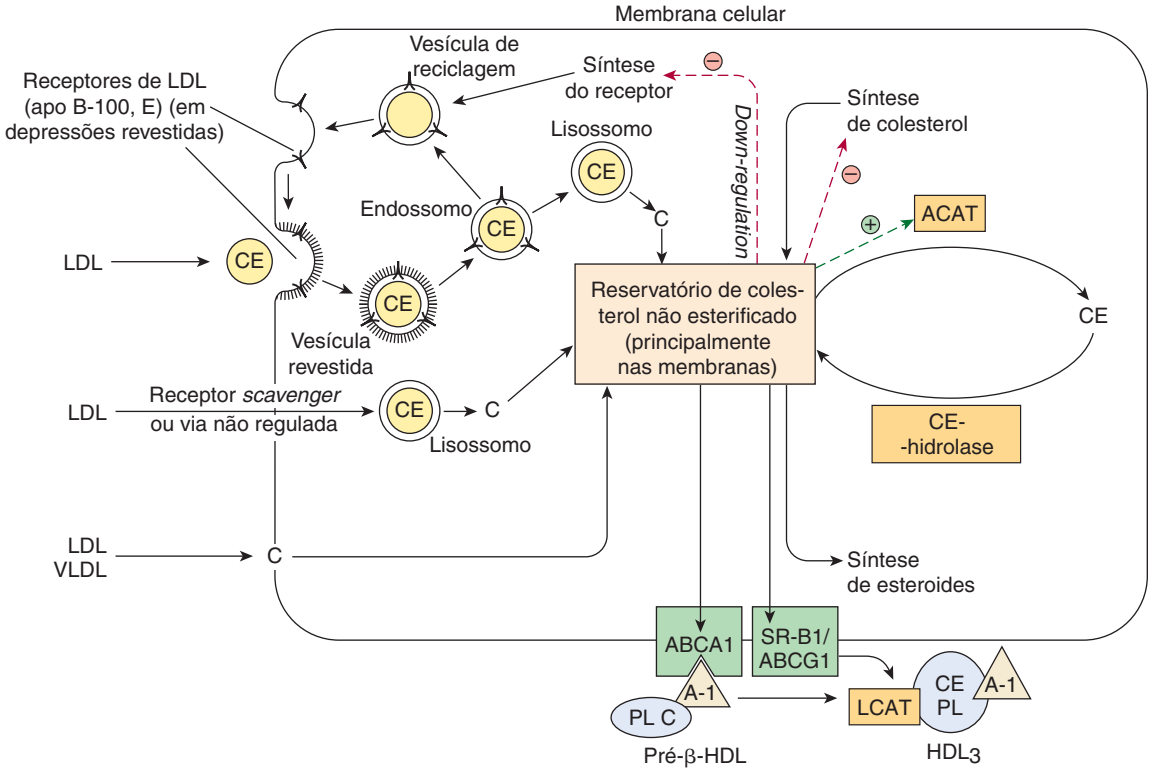


FIGURA 26-5 Fatores que afetam o equilíbrio do colesterol em nível celular. O transporte reverso do colesterol pode ser mediado pela proteína transportadora ABCA-1 (com a pré-β-HDL atuando como aceptor exógeno) ou SR-B1 ou ABCG-1 (com HDL_3 atuando como aceptor exógeno). (A-1, apolipoproteína A-I; ACAT, acil-CoA: colesterol aciltransferase; C, colesterol; CE, éster de colesterol; LCAT, lecitina:colesterol aciltransferase; LDL, lipoproteína de baixa densidade; PL, fosfolipídeo; VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa.) As LDL e HDL não estão representadas na escala.

O receptor de LDL é altamente regulado

. O receptor de glicoproteína estende-se por toda a membrana, com a região de ligação de B-100 localizada na extremidade aminoterminal exposta.

Dessa maneira, a atividade do receptor de LDL na superfície celular é regulada pelas necessidades de colesterol para as membranas, para a síntese de hormônios esteroides ou de ácidos biliares (Figura 26-5).

O COLESTEROL É TRANSPORTADO ENTRE OS TECIDOS PELAS LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS

(**Figura 26-6**)

O éster de colesterol presente na dieta é hidrolisado em colesterol, que é então absorvido pelo intestino, juntamente com o colesterol não esterificado e outros lipídeos da dieta. Juntamente com o colesterol sintetizado no intestino, é incorporado, a seguir, nos quilomícrons (Capítulo 25).

A LCAT plasmática é responsável pela formação de praticamente todo o éster de colesterol plasmático nos seres humanos

A atividade da está associada à HDL, que contém apo A-I. À medida que o colesterol da HDL torna-se esterificado,

(Figuras 26-5 e 26-6), permitindo,

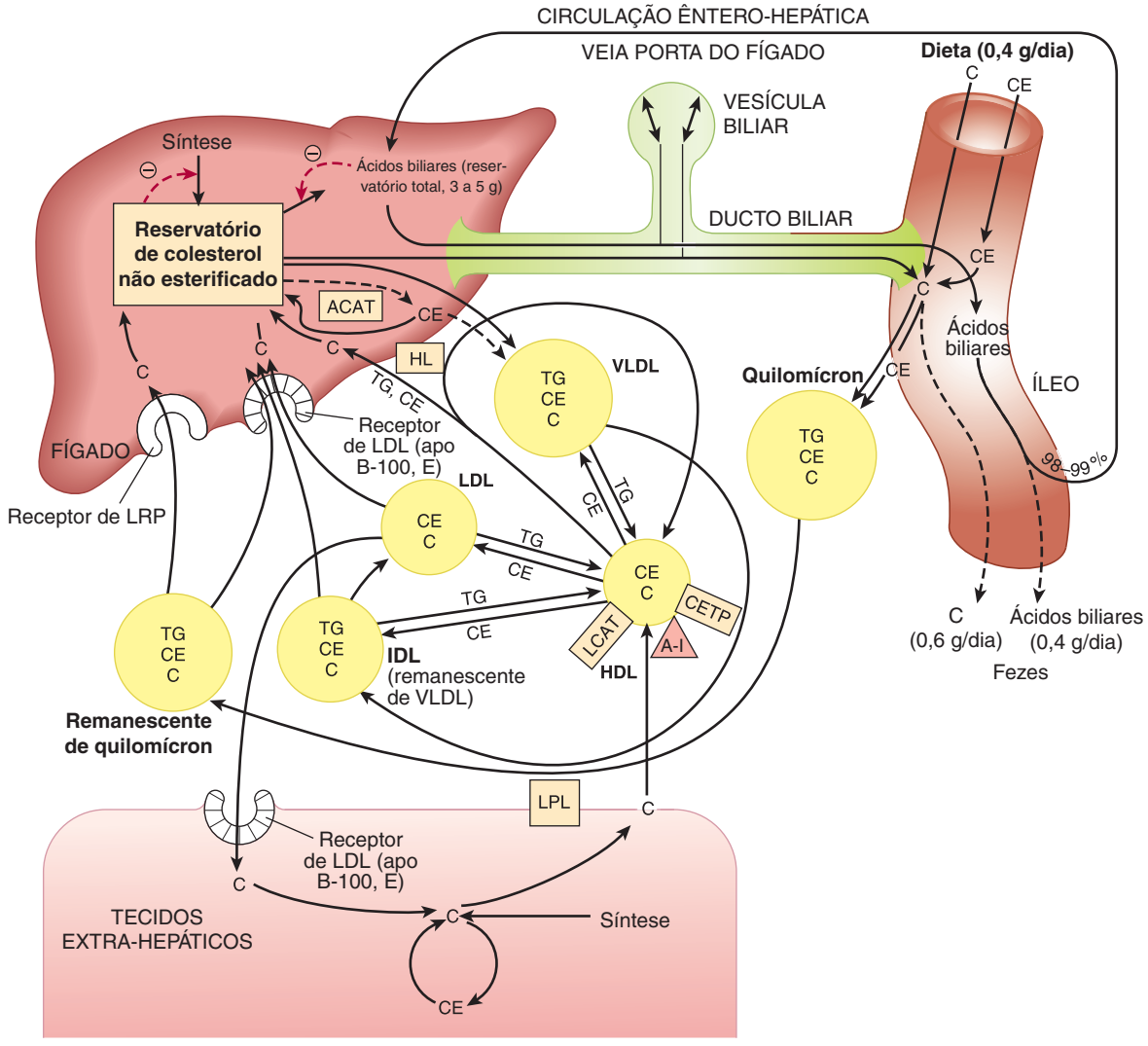


FIGURA 26-6 Transporte do colesterol entre os tecidos nos seres humanos. (A-I, apolipoproteína A-I; ACAT, acil-CoA:colesterol-aciltransferase; C, colesterol não esterificado; CE, éster de colesteril; CETP, proteína de transferência de éster de colesterol; HDL, lipoproteína de alta densidade; HL, lipase hepática; IDL, lipoproteína de densidade intermediária; LCAT, lecitina:colesterol-aciltransferase; LDL, lipoproteína de baixa densidade; LPL, lipase lipoproteica; LRP, proteína relacionada com o receptor de LDL; TG, triacilglicerol; VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa.)

assim, que a HDL funcione no **transporte reverso do colesterol** (Figura 25-5).

A proteína de transferência de éster de colesterol facilita a transferência do éster de colesterol das HDL para outras lipoproteínas

Por conseguinte, nos seres humanos, grande parte do éster de colesterol formado pela LCAT alcança o fígado por meio dos remanescentes de VLDL (IDL) ou LDL (Figura 26-6). A HDL_2 enriquecida com triacilglicerol libera o seu colesterol no fígado no ciclo da HDL (Figura 25-5).

O COLESTEROL É EXCRETADO PELO ORGANISMO NA BILE SOB A FORMA DE COLESTEROL OU ÁCIDOS (SAIS) BILIARES

O colesterol é excretado pelo organismo por meio da bile, na forma não esterificada ou após conversão em ácidos biliares no fígado.

Os ácidos biliares são formados a partir do colesterol

(**Figura 26-7**). A 7α-hidroxilação do colesterol constitui a primeira e principal etapa reguladora na biossíntese dos ácidos biliares e é catalisada pela . As etapas subsequentes de hidroxilação também são catalisadas por monoxigenases. A via de biossíntese dos ácidos biliares é dividida inicialmente em uma via que leva à formação de **colil-CoA**, caracterizada por um grupo α-OH adicional na posição 12, e em outra via, que leva à produção de **quenodesoxicolil-CoA** (Figura 26-7). Uma segunda via nas mitocôndrias, que envolve a 27-hidroxilação do colesterol pela **esterol 27-hidroxilase** como primeira etapa, é responsável por uma proporção significativa dos ácidos biliares primários sintetizados.

A conjugação ocorre nos peroxissomos hepáticos. Nos seres humanos, a razão entre os conjugados de glicina e taurina é normalmente de 3:1.

A maior parte dos ácidos biliares retorna ao fígado pela circulação êntero-hepática

Embora os produtos da digestão das gorduras, incluindo o colesterol, sejam absorvidos nos primeiros 100 cm do intestino del-

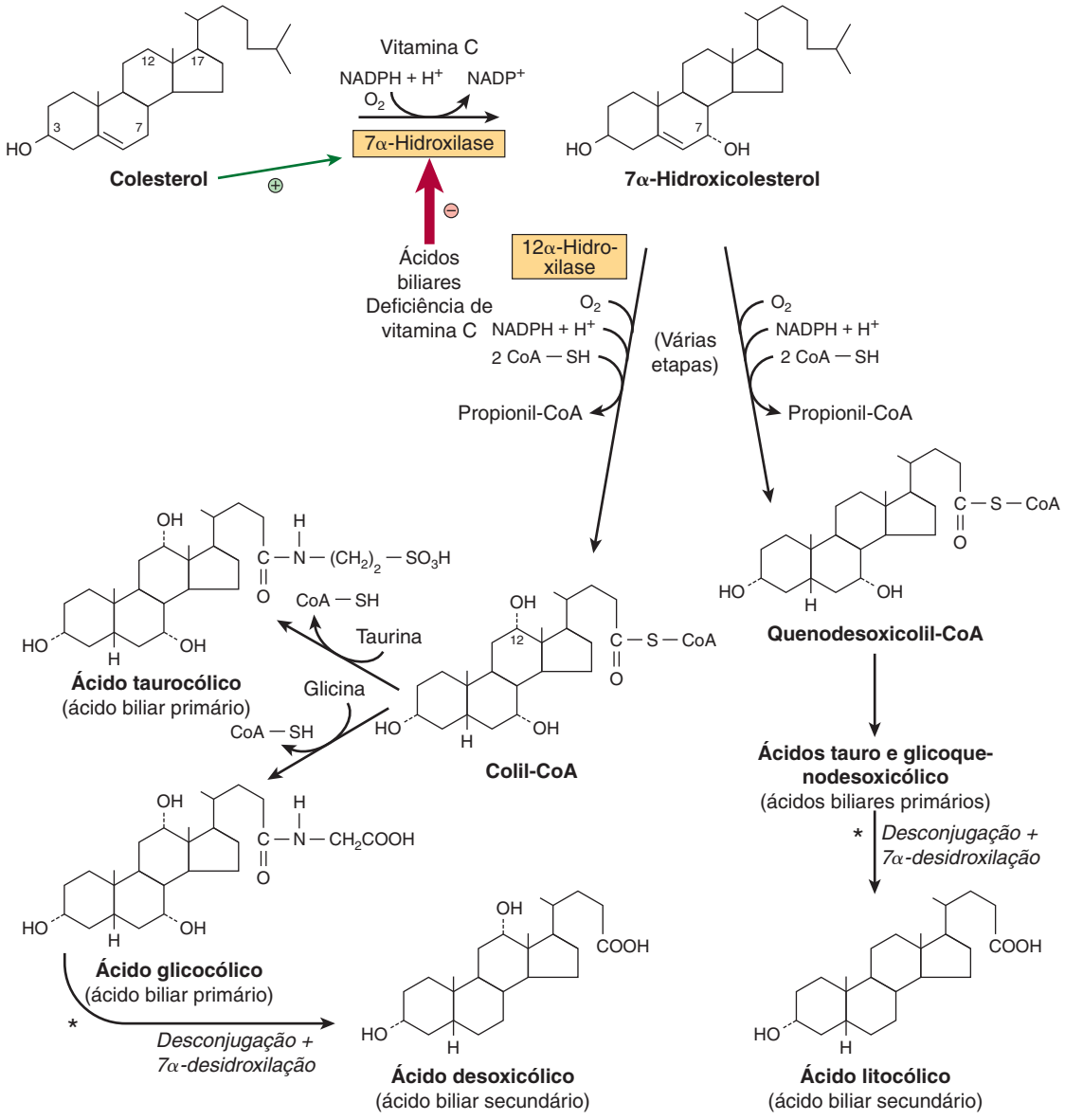


FIGURA 26-7 Biossíntese e degradação dos ácidos biliares. Uma segunda via presente nas mitocôndrias envolve a hidroxilação do colesterol pela esterol 27-hidroxilase. (*Catalisada por enzimas microbianas.)

gado, os ácidos biliares primários e secundários são absorvidos quase exclusivamente no íleo, e 98 a 99% retornam ao fígado pela circulação portal. Esse processo é conhecido como **circulação êntero-hepática** (Figura 26-6). Entretanto, em virtude de sua insolubilidade, o ácido litocólico não é reabsorvido em quantidades significativas. Apenas uma fração pequena dos sais biliares escapa da absorção e, portanto, é eliminada nas fezes. Todavia, isso representa uma importante via de eliminação do colesterol. Diariamente, o reservatório de ácidos biliares (cerca de 3 a 5 g) circula seis a dez vezes pelo intestino, e uma quantidade de ácidos biliares equivalente àquela perdida nas fezes é sintetizada a partir do colesterol, com consequente manutenção de um reservatório de ácidos biliares de tamanho constante. Esse processo é obtido por um sistema de controle por retroalimentação.

A atividade dessa enzima é regulada por retroalimentação pelo receptor nuclear de ligação a ácidos biliares, c . Quando o tamanho do reservatório de ácidos biliares na circulação êntero-hepática aumenta, o FXR é ativado, e a transcrição do gene da colesterol 7α-hidroxilase é suprimida. O ácido quenodesoxicólico é particularmente importante na ativação do FXR. A atividade da colesterol 7α-hidroxilase também é aumentada pelo colesterol de origem endógena e da dieta e regulada pela insulina, pelo glucagon, pelos glicocorticoides e pelo hormônio tireoidiano.

ASPECTOS CLÍNICOS

O colesterol sérico está correlacionado com a incidência de aterosclerose e coronariopatia

Embora os níveis plasmáticos elevados de colesterol (> 5,2 mmol/L) sejam considerados como importante fator no desenvolvimento da aterosclerose, sabe-se hoje que os triacilgliceróis constituem um fator de risco independente. A aterosclerose caracteriza-se pelo depósito de colesterol e éster de colesterol das lipoproteínas plasmáticas na parede arterial. As doenças nas quais existe uma elevação prolongada dos níveis de VLDL, IDL, remanescentes de quilomícrons ou LDL no sangue (p. ex., diabetes melito, nefrose lipídica, hipotireoidismo e outras condições de hiperlipidemia) são frequentemente acompanhadas de aterosclerose prematura ou mais severa. Existe também uma relação inversa entre as concentrações de HDL (HDL_2) e a coronariopatia, tornando a **razão colesterol LDL:HDL um parâmetro preditivo confiável.** Isso é compatível com a função das HDL no transporte reverso do colesterol. A suscetibilidade à aterosclerose varia amplamente entre as espécies, e os seres humanos constituem uma das poucas espécies nas quais a doença pode ser induzida por dietas ricas em colesterol.

A dieta pode desempenhar um importante papel na redução do colesterol sérico

Os fatores hereditários desempenham o papel mais importante na determinação das concentrações séricas de colesterol no indivíduo; entretanto, os fatores nutricionais e ambientais também desempenham um papel, e, entre esses fatores, o mais benéfico consiste em substituir, na dieta, os ácidos graxos saturados por **ácidos graxos poli-insaturados** e **monoinsaturados**. Os óleos vegetais, como o óleo de milho e o óleo de semente de girassol, contêm uma alta proporção de ácidos graxos poli-insaturados, enquanto o azeite contém a alta concentração de ácidos graxos monoinsaturados. Por outro lado, as gorduras da manteiga e da carne e o óleo de palma contêm uma elevada proporção de ácidos graxos saturados. A sacarose e a frutose exercem um maior efeito na elevação dos lipídeos sanguíneos, particularmente os triacilgliceróis, em comparação com outros carboidratos.

O mecanismo envolvido no efeito dos ácidos graxos poli-insaturados sobre a redução do colesterol ainda não está totalmente elucidado. Entretanto, é evidente que um dos mecanismos envolvidos consiste na *upregulation* dos receptores de LDL pelos ácidos graxos poli-insaturados e monoinsaturados, em comparação com os saturados, resultando em aumento da taxa catabólica da LDL, a principal lipoproteína aterogênica. Além disso, os ácidos graxos saturados levam à formação de partículas menores de VLDL, que contêm quantidades relativamente maiores de colesterol e que são utilizadas pelos tecidos extra-hepáticos em uma taxa mais lenta do que as partículas maiores – tendência que pode ser considerada aterogênica.

O estilo de vida afeta os níveis séricos de colesterol

Outros fatores que parecem desempenhar um papel na coronariopatia incluem a **hipertensão arterial**, **o tabagismo**, **o sexo masculino**, **a obesidade** (**particularmente a obesidade abdominal**), **a falta de exercícios físicos e a ingestão de água mole em lugar de água dura**. Os fatores associados a uma elevação dos AGL plasmáticos, seguida de aumento da liberação de triacilglicerol e colesterol na circulação, na forma de VLDL, incluem **estresse emocional e consumo de café**. As mulheres pré-menopausa parecem estar protegidas de muitos desses fatores deletérios, e acredita-se que essa proteção esteja relacionada com os efeitos benéficos do **estrogênio**. Existe uma associação entre o consumo moderado de álcool e uma incidência mais baixa de coronariopatia. Isso pode ser atribuído à elevação das concentrações de HDL em decorrência da síntese aumentada de apo A-I e de alterações na atividade da proteína de transferência de éster de colesterol. Foi sustentado que o vinho tinto é particularmente benéfico, talvez em virtude de seu teor de antioxidantes. A prática regular de exercícios físicos reduz os níveis plasmáticos de LDL e aumenta os níveis de HDL. As concentrações de triacilgliceróis também são reduzidas, devido, mais provavelmente, ao aumento da sensibilidade à insulina, que intensifica a expressão da lipase lipoproteica.

Quando as alterações dietéticas não têm efeito, os fármacos hipolipidêmicos reduzem os níveis séricos de colesterol e triacilglicerol

Uma família de fármacos conhecidos como estatinas demonstrou ser altamente eficaz na redução do colesterol plasmático e

TABELA 26-1 Principais distúrbios das lipoproteínas plasmáticas (dislipoproteinemias)

Nome	Defeito	Comentários
Hipolipoproteinemias Abetalipoproteinemia	Não há formação de quilomícrons, VLDL ou LDL, devido a um defeito na ligação da apo B aos lipídeos.	Rara; os níveis sanguíneos de acilgliceróis estão baixos; o intestino e o fígado acumulam acilgliceróis. Má absorção intestinal. A morte precoce pode ser evitada pela administração de grandes doses de vitaminas lipossolúveis, particularmente vitamina E.
Deficiência familiar de alfa lipoproteína Doença de Tangier Doença do olho-de-peixe Deficiências de apo-A-I	Todas apresentam níveis baixos ou quase ausentes de HDL.	Tendência à hipertriacilglicerolemia em consequência da ausência de C-II, causando inativação da LPL. Baixos níveis de LDL. Aterosclerose no idoso.
Hiperlipoproteinemias Deficiência familiar de lipoproteína lipase (tipo I)	Hipertriacilglicerolemia devido à deficiência de LPL, LPL anormal ou deficiência de apo C-II, resultando em inativação da LPL.	Depuração lenta dos quilomícrons e VLDL. Baixos níveis de LDL e HDL. Nenhum risco aumentado de coronariopatia.
Hipercolesterolemia familiar (tipo IIa)	Receptores de LDL defeituosos ou mutação na região do ligante da apo B-100.	Níveis elevados de LDL e hipercolesterolemia, resultando em aterosclerose e coronariopatia.
Hiperlipoproteinemia familiar tipo III (doença beta larga, doença de remoção dos remanescentes, disbetalipoproteinemia familiar)	A deficiência na depuração dos remanescentes pelo fígado é causada por uma anormalidade da apo-E. Os pacientes carecem das isoformas E3 e E4 e só apresentam E2, a qual não reage com o receptor E.[1]	Aumento dos remanescentes de quilomícrons e VLDL com densidade $< 1{,}019$ (β-VLDL). Causa hipercolesterolemia, xantomas e aterosclerose.
Hipertriacilglicerolemia familiar (tipo IV)	A produção excessiva de VLDL está frequentemente associada à intolerância à glicose e à hiperinsulinemia.	Os níveis de colesterol aumentam com a concentração de VLDL. As LDL e HDL tendem a estar abaixo do normal. Esse padrão está comumente associado a coronariopatia, diabetes melito do tipo II, obesidade, alcoolismo e administração de hormônios progestacionais.
Hiperalfalipoproteinemia familiar	Concentrações aumentadas de HDL.	Distúrbio raro, aparentemente benéfico à saúde e longevidade.
Deficiência de lipase hepática	A deficiência dessa enzima leva ao acúmulo de HDL rica em triacilglicerol e remanescentes de VLDL grandes.	Os pacientes apresentam xantomas e coronariopatia.
Deficiência familiar de lecitina: colesterol aciltransferase (LCAT)	Ausência da LCAT leva um bloqueio do transporte reverso do colesterol. A HDL permanece na forma de discos nascentes, incapazes de captar e de esterificar o colesterol.	As concentrações plasmáticas de ésteres de colesterol e de lisolecitina estão baixas. Fração LDL anormal, lipoproteína X, também encontrada em pacientes com colestase. A VLDL está anormal (β-VLDL).
Excesso familiar de lipoproteína(a)	A Lp(a) consiste em 1 mol de LDL ligado à 1 mol de apo(a). A apo(a) exibe homologias estruturais com o plasminogênio.	Coronariopatia prematura devido à aterosclerose, mais trombose em consequência da inibição da fibrinólise.

[1]Existe uma associação entre pacientes que apresentam o alelo apo E4 e a incidência da doença de Alzheimer. Aparentemente, a apo E4 liga-se com maior afinidade ao β-amiloide encontrado nas placas neuríticas.

na prevenção da doença cardíaca. As estatinas atuam por meio da inibição da HMG-CoA-redutase e *up regulation* da atividade do receptor de LDL. A **atorvastatina**, a **sinvastatina**, a **fluvastatina** e a **pravastatina** são exemplos de fármacos dessa família atualmente usados. A **ezetimiba** reduz os níveis sanguíneos de colesterol ao inibir a sua absorção pelo intestino por meio do bloqueio de sua captação pela **proteína 1 semelhante a Niemann-Pick C**. Outros fármacos usados incluem os fibratos, como o **clofibrato**, a **genfibrozila e o ácido nicotínico**, que atuam principalmente na redução dos níveis plasmáticos de triacilgliceróis ao diminuir a secreção hepática de VLDL contendo triacilglicerol e colesterol.

Os distúrbios primários das lipoproteínas plasmáticas (dislipoproteinemias) são hereditários

Os defeitos hereditários no metabolismo das lipoproteínas levam à condição primária de **hipolipoproteinemia** ou **hiperlipoproteinemia** (**Tabela 26-1**). Além disso, doenças como o diabetes melito, o hipotireoidismo, a doença renal (síndrome nefrótica) e a aterosclerose estão associadas a padrões anormais secundários de lipoproteínas, que são muito semelhantes a um ou outro dos distúrbios hereditários primários. Quase todos os distúrbios primários são causados por um defeito em um es-

tágio na formação, transporte ou degradação das lipoproteínas (ver Figuras 25-4, 26-5 e 26-6). Nem todas essas anormalidades são prejudiciais.

RESUMO

- O colesterol é o precursor de todos os esteroides do organismo, como, por exemplo, os corticosteroides, os hormônios sexuais, os ácidos biliares e a vitamina D. Além disso, desempenha um importante papel estrutural nas membranas e na camada externa das lipoproteínas.
- O colesterol é inteiramente sintetizado no organismo a partir de acetil-CoA. Três moléculas de acetil-CoA formam o mevalonato pela reação reguladora importante da via, catalisada pela HMG-CoA redutase. Em seguida, uma unidade isoprenoide de cinco carbonos é sintetizada, e seis dessas unidades condensam-se para formar o esqualeno. O esqualeno sofre ciclização para formar o esteroide original, o lanosterol, que, após a remoção de três grupos metila e outras alterações, forma o colesterol.
- A síntese do colesterol no fígado é regulada, em parte, pelo colesterol da dieta. Nos tecidos, o equilíbrio do colesterol é mantido entre os fatores que produzem um ganho de colesterol (p. ex., síntese, captação por meio dos receptores de LDL ou receptores *scavenger*) e aqueles que causam perda do colesterol (p. ex., síntese de esteroides, formação de ésteres de colesterol, excreção). Para alcançar esse equilíbrio, a atividade do receptor de LDL é modulada pelos níveis celulares de colesterol. No transporte reverso do colesterol, a HDL o capta dos tecidos, e a LCAT o esterifica e o deposita no núcleo das partículas. O éster de colesterol da HDL é captado pelo fígado, diretamente ou após transferência para as VLDL, IDL ou LDL por meio da proteína de transferência de éster de colesterol.
- O colesterol em excesso é excretado pelo fígado na bile, sob a forma de colesterol ou sais biliares. Uma grande proporção de sais biliares é absorvida na circulação portal e retorna ao fígado como parte da circulação êntero-hepática.
- Os níveis elevados de colesterol presentes em VLDL, IDL ou LDL estão associados à aterosclerose, enquanto os níveis elevados de HDL exercem um efeito protetor.
- Os defeitos hereditários do metabolismo das lipoproteínas levam a uma condição primária de hipolipoproteinemia ou hiperlipoproteinemia. Certas doenças, como o diabetes melito, o hipotireoidismo, a doença renal e a aterosclerose, exibem padrões anormais secundários de lipoproteína, que se assemelham a alguns dos distúrbios primários.

REFERÊNCIAS

Agellon LB: Metabolism and function of bile acids. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th ed. Vance DE, Vance JE (editors). Elsevier, 2008:423–440.

Chiang JL: Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors and mechanisms. J Hepatol 2004;40:539.

Denke MA: Dietary fats, fatty acids and their eff ects on lipoproteins. Curr Atheroscler Rep 2006;8:466.

Djoussé L, Gaziano JM: Dietary cholesterol and coronary disease risk: a systematic review. Curr Atheroscler Rep 2009;11:418.

Fernandez ML, West KL: Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. J Nutr 2005;135:2075.

Jiang XC, Zhou HW: Plasma lipid transfer proteins. Curr Opin Lipidol 2006;17:302.

Liscum L: Cholesterol biosynthesis. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th ed. Vance DE, Vance JE (editors). Elsevier, 2008:399–422.

Ness GC, Chambers CM: Feedback and hormonal regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: the concept of cholesterol buff ering capacity. Proc Soc Exp Biol Med 2000;224:8.

Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, et al: Bile acids: natural ligands for a nuclear orphan receptor. Science 1999;284:1365.

Perez-Sala D: Protein isoprenylation in biology and disease: general overview and perspectives from studies with genetically engineered animals. Front Biosci 2007;12:4456.

Questões para Estudo

Seção II

1. Diversos compostos inibem a fosforilação oxidativa – a síntese de ATP a partir do ADP e do fosfato inorgânico ligado à oxidação de substratos nas mitocôndrias. Qual das afirmações a seguir descreve a ação da oligomicina?
   A. Ela descarrega o gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna.
   B. Ela descarrega o gradiente de prótons através da membrana mitocondrial externa.
   C. Ela inibe a cadeia de transporte de elétrons diretamente pela sua ligação a um dos carreadores de elétrons na membrana mitocondrial interna.
   D. Ela inibe o transporte de ADP para dentro da matriz mitocondrial e de ATP para o exterior.
   E. Ela inibe o transporte de prótons de volta à matriz mitocondrial através da haste da partícula primária.

2. Diversos compostos inibem a fosforilação oxidativa – a síntese de ATP a partir do ADP e do fosfato inorgânico ligado à oxidação de substratos nas mitocôndrias. Qual das afirmações a seguir descreve a ação de um desacoplador?
   A. Ele descarrega o gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna.
   B. Ele descarrega o gradiente de prótons através da membrana mitocondrial externa.
   C. Ele inibe a cadeia de transporte de elétrons diretamente pela sua ligação a um dos carreadores de elétrons na membrana mitocondrial interna.
   D. Ele inibe o transporte de ADP para dentro da matriz mitocondrial e de ATP para o exterior.
   E. Ele inibe o transporte de prótons de volta à matriz mitocondrial através da haste da partícula primária.

3. Uma estudante toma alguns comprimidos que lhe ofereceram em uma casa noturna e, sem perguntar quais comprimidos são aqueles, ela os deglute. Pouco depois ela começa a hiperventilar e fica muito quente. Qual a ação mais provável dos comprimidos que ela tomou?
   A. Inibidor da síntese mitocondrial de ATP.
   B. Inibidor do transporte mitocondrial de elétrons.
   C. Inibidor do transporte de ADP nas mitocôndrias para fosforilação.
   D. Inibidor do transporte de ATP das mitocôndrias para o citosol.
   E. Desacoplador do transporte mitocondrial de elétrons e fosforilação oxidativa.

4. AA alimenta-se de modo muito precário e consome duas garrafas de vodka por dia. É internado em um hospital em estado de coma. Está hiperventilando e apresenta hipotensão e débito cardíaco elevado. A radiografia de tórax revela aumento do coração. Os exames laboratoriais mostram que ele está com deficiência de tiamina (vitamina B_1). Qual das seguintes enzimas está mais provavelmente afetada?
   A. Lactato-desidrogenase
   B. Piruvato-carboxilase
   C. Piruvato-descarboxilase
   D. Piruvato-desidrogenase
   E. Piruvato-quinase

5. Na monitoração do controle glicêmico de pacientes diabéticos, a glicose da urina ou do sangue pode ser medida de duas maneiras: quimicamente, usando um reagente de cobre alcalino que detecta compostos redutores, e bioquimicamente, utilizando a enzima glicose oxidase. Em uma série de experimentos, ambos os métodos foram empregados na mesma amostra de urina, e o resultado foi positivo para o reagente de cobre alcalino e negativo com a glicose oxidase. Qual o diagnóstico mais provável para o paciente que realizou o exame?
   A. Diabético com controle glicêmico adequado.
   B. Diabético com controle glicêmico precário.
   C. Pessoa saudável normal que permaneceu em jejum durante a noite.
   D. Pessoa saudável normal que acabou de ingerir uma refeição.
   E. Pessoa saudável que apresenta pentosúria essencial.

6. Um homem de 25 anos de idade se submete a um jejum prolongado por motivos religiosos. Qual dos seguintes metabólitos estará elevado no plasma sanguíneo depois de 24 horas?
   A. Glicose
   B. Glicogênio
   C. Corpos cetônicos
   D. Ácidos graxos não esterificados
   E. Triacilglicerol

7. Um homem de 25 anos de idade se submete a um jejum prolongado por motivos religiosos. Qual dos seguintes metabólitos estará mais elevado no plasma sanguíneo após 3 dias?
   A. Glicose
   B. Glicogênio
   C. Corpos cetônicos
   D. Ácidos graxos não esterificados
   E. Triacilglicerol

8. Um homem de 25 anos de idade consulta o seu clínico geral com queixas de cólicas abdominais e diarreia após a ingestão de leite. Qual a causa mais provável do problema?
   A. Supercrescimento de bactérias e leveduras no intestino grosso.
   B. Infecção pelo parasito intestinal *Giardia lamblia*.
   C. Ausência de amilase pancreática.
   D. Ausência de lactase no intestino delgado.
   E. Ausência de sacarose-isomaltase no intestino delgado.

9. Qual das afirmações a seguir sobre o favismo (deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase) e a via das pentoses-fosfato é CORRETA?
   A. No favismo, os eritrócitos são mais suscetíveis ao estresse oxidativo devido à ausência de NADPH para a síntese de ácidos graxos.

B. Os indivíduos que carecem de glicose-6-fosfato-desidrogenase não podem sintetizar ácidos graxos, devido a uma falta de NADPH no fígado e no tecido adiposo.
C. A via das pentoses-fosfato é particularmente importante nos tecidos que sintetizam ácidos graxos.
D. A via das pentoses-fosfato constitui a única fonte de NADPH para a síntese de ácidos graxos.
E. A via das pentoses-fosfato fornece uma alternativa para a glicólise apenas em jejum.

10. Qual das afirmações a seguir sobre a síntese e a utilização do glicogênio é CORRETA?
A. O glicogênio é sintetizado no fígado no estado alimentado e, em seguida, é exportado para outros tecidos nas lipoproteínas de baixa densidade.
B. As reservas de glicogênio no fígado e no músculo atendem às necessidades de energia durante vários dias no jejum prolongado.
C. O fígado sintetiza mais glicogênio quando a concentração de glicose no sangue da veia porta do fígado está elevada, devido à atividade da glicoquinase no fígado.
D. O músculo sintetiza glicogênio no estado alimentado, visto que a glicogênio-fosforilase é ativada em resposta à insulina.
E. A concentração plasmática de glicogênio aumenta no estado alimentado.

11. Na glicólise, a conversão de 1 mol de frutose-1,6-bifosfato em 2 moles de piruvato resulta na formação de:
A. 1 mol de NAD^+ e 2 mols de ATP.
B. 1 mol de NADH e 1 mol de ATP.
C. 2 mols de NAD^+ e 4 mols de ATP.
D. 2 mols de NADH e 2 mols de ATP.
E. 2 mols de NADH e 4 mols de ATP.

12. Qual das afirmações a seguir sobre o metabolismo dos ácidos graxos é CORRETA?
A. A acilcarnitina é formada a partir da acil-CoA e da carnitina na face interna da membrana mitocondrial interna.
B. A acil-CoA só pode atravessar a membrana mitocondrial interna em troca da CoA livre que deixa a matriz mitocondrial.
C. A creatinina é essencial para o transporte de ácidos graxos para dentro da matriz mitocondrial.
D. No estado alimentado, a principal fonte de ácidos graxos para os tecidos consiste em triacilglicerol dos quilomícrons e lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL).
E. A β-oxidação dos ácidos graxos ocorre no citosol.

13. Qual das afirmações a seguir sobre a síntese de gorduras é CORRETA?
A. A síntese de triacilglicerol no tecido adiposo só pode ocorrer quando está havendo gliconeogênese.
B. A síntese de triacilglicerol no tecido adiposo é estimulada quando a razão insulina/glucagon está baixa.
C. A síntese de triaciglicerol no fígado só pode ocorrer quando a glicólise está ativa.
D. O triacilglicerol é sintetizado a partir de glicerol-3-fosfato e acil-CoA no tecido adiposo.
E. O triacilglicerol é sintetizado a partir de monoacilglicerol e acil-CoA no tecido adiposo.

14. Qual das lipoproteínas plasmáticas é mais bem descrita da seguinte maneira: sintetizada na mucosa intestinal, contendo uma alta concentração de triacilglicerol e depurada da circulação principalmente pelo tecido adiposo e músculo?
A. Quilomícrons
B. Lipoproteína de alta densidade
C. Lipoproteína de densidade intermediária
D. Lipoproteína de baixa densidade
E. Lipoproteína de densidade muito baixa

15. Qual das lipoproteínas plasmáticas é mais bem descrita da seguinte maneira: sintetizada no fígado, contendo uma alta concentração de triacilglicerol e depurada da circulação principalmente pelo tecido adiposo e músculo?
A. Quilomícrons
B. Lipoproteína de alta densidade
C. Lipoproteína de densidade intermediária
D. Lipoproteína de baixa densidade
E. Lipoproteína de densidade muito baixa.

16. Qual das lipoproteínas plasmáticas é mais bem descrita da seguinte maneira: formada na circulação pela remoção de triacilglicerol das lipoproteínas de densidade muito baixa, contendo colesterol captado das lipoproteínas de alta densidade e depurada pelo fígado?
A. Quilomícrons
B. Lipoproteína de alta densidade
C. Lipoproteína de densidade intermediária
D. Lipoproteína de baixa densidade
E. Lipoproteína de densidade muito baixa

17. Qual dos seguintes compostos estará elevado na corrente sanguínea aproximadamente 2 horas após ingerir uma refeição rica em gordura?
A. Quilomícrons
B. Lipoproteína de alta densidade
C. Corpos cetônicos
D. Ácidos graxos não esterificados
E. Lipoproteína de densidade muito baixa

18. Qual dos seguintes compostos estará elevado na corrente sanguínea aproximadamente 4 horas após ingerir uma refeição rica em gordura?
A. Quilomícrons
B. Lipoproteína de alta densidade
C. Corpos cetônicos
D. Ácidos graxos não esterificados
E. Lipoproteína de densidade muito baixa

19. Após a sua produção a partir da acetil-CoA no fígado, em qual dos seguintes processos os corpos cetônicos são principalmente usados?
A. Excreção como produtos de degradação.
B. Geração de energia no fígado.
C. Conversão em ácidos graxos para armazenamento de energia.
D. Geração de energia nos tecidos.
E. Geração de energia nos eritrócitos.

20. Qual das afirmações a seguir sobre a biossíntese do colesterol é CORRETA?
A. A etapa limitadora de velocidade é a formação de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) pela enzima HMG-CoA-sintase.
B. A síntese ocorre no citosol da célula.

C. Todos os átomos de carbono do colesterol sintetizado originam-se da acetil-CoA.
D. O esqualeno é o primeiro intermediário cíclico da via.
E. O substrato inicial é o mevalonato.

21. A classe de fármacos denominados estatinas provou ser muito efetiva contra a hipercolesterolemia, uma importante causa de aterosclerose e de doença cardiovascular associada. Esses fármacos reduzem os níveis plasmáticos de colesterol por meio da seguinte ação:
A. Impedem a absorção de colesterol do intestino.
B. Aumentam a excreção de colesterol do corpo por meio de sua conversão em ácidos biliares.
C. Inibem a conversão da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA em mevalonato na via de biossíntese do colesterol.
D. Aumentam a taxa de degradação da 3-hidroxi-3--metilglutaril-CoA-redutase.
E. Estimulam a atividade do receptor de LDL no fígado.

22. Qual das afirmações a seguir sobre a variação da energia livre (ΔG) em uma reação bioquímica é CORRETA?
A. Se ΔG for negativa, a reação prossegue espontaneamente com perda de energia livre.
B. Em uma reação exergônica, ΔG é positiva.
C. A variação padrão de energia livre quando os reagentes estão presentes em concentrações de 1,0 mol/L, e o pH é de 7,0 é representada como ΔG^0.
D. Em uma reação endergônica, a ΔG é negativa.
E. Se ΔG for 0, a reação é essencialmente irreversível.

23. Qual das afirmações a seguir sobre o ciclo do ácido cítrico é CORRETA?
A. Produz a maior parte do ATP nos organismos anaeróbios.
B. Oxida a acetil-CoA derivada da oxidação dos ácidos graxos.
C. Fornece acetil-CoA para a síntese de ácidos graxos.
D. A sua velocidade diminui quando o nível de energia está baixo.
E. Fornece ATP principalmente por fosforilação ligada a substrato.

24. Qual dos seguintes compostos é o principal produto da ácido graxo sintase?
A. Acetil-CoA
B. Oleato
C. Palmitoil-CoA
D. Acetoacetato
E. Palmitato

25. Qual das afirmações a seguir sobre os quilomícrons é CORRETA?
A. Os quilomícrons são formados no interior das células intestinais e secretadas na linfa, onde adquirem as apolipoproteínas B e C.
B. O núcleo dos quilomícrons contém triacilglicerol e fosfolipídeos.
C. A enzima lipase sensível a hormônio atua sobre os quilomícrons, liberando ácidos graxos do triacilglicerol quando estão ligados à superfície das células endoteliais nos capilares sanguíneos.
D. Os remanescentes de quilomícrons diferem dos quilomícrons por serem menores e conter uma menor proporção de triacilglicerol.
E. Os quilomícrons são captadas pelo fígado.

26. Para cada volta do ciclo do ácido cítrico, três moléculas de NADH e 1 molécula de $FADH_2$ são formadas e oxidadas por meio da cadeia respiratória, produzindo:
A. 10 moléculas de ATP
B. 4 moléculas de ATP
C. 9 moléculas de ATP
D. 7 moléculas de ATP
E. 12 moléculas de ATP

27. O local subcelular de degradação dos ácidos graxos de cadeia longa em acetil-CoA pela β-oxidação é:
A. O citosol
B. A matriz das mitocôndrias
C. O retículo endoplasmático
D. O espaço intermembranas mitocondrial
E. O aparelho de Golgi

28. Qual das afirmações a seguir sobre as moléculas de ácido graxo é CORRETA?
A. Consistem em uma cabeça de ácido carboxílico ligada a uma cadeia de carboidrato.
B. São denominadas poli-insaturadas quando contêm uma ou mais ligações duplas de carbono-carbono.
C. Seus pontos de fusão aumentam com a insaturação crescente.
D. Quase sempre apresentam duplas ligações na configuração *cis* quando são de ocorrência natural.
E. Ocorrem no organismo principalmente na forma de ácidos graxos livres (não esterificados).

29. Normalmente, o fluxo de elétrons através da cadeia respiratória e a produção de ATP estão firmemente acoplados. Os processos são desacoplados por:
A. Cianeto
B. Oligomicina
C. Termogenina
D. Monóxido de carbono
E. Sulfeto de hidrogênio

SEÇÃO

III

Metabolismo das Proteínas e dos Aminoácidos

CAPÍTULO

27

Biossíntese dos Aminoácidos Nutricionalmente Não Essenciais

Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Explicar por que a ausência de alguns aminoácidos na dieta não é deletéria para a saúde humana.
- Reconhecer a distinção entre aminoácidos "essenciais" e "nutricionalmente essenciais", e identificar aqueles que não são nutricionalmente essenciais.
- Citar os intermediários do ciclo do ácido cítrico e glicolíticos que são precursores do aspartato, da asparagina, do glutamato, da glutamina, da glicina e da serina.
- Reconhecer o papel-chave das transaminases no metabolismo dos aminoácidos.
- Explicar o processo pelo qual são formadas a hidroxiprolina e a hidroxilisina das proteínas.
- Fornecer uma explicação bioquímica para a razão pela qual uma grave privação de vitamina C (ácido ascórbico) resulta na doença nutricional conhecida como escorbuto, e descrever as consequências clínicas desse distúrbio nutricional.
- Reconhecer que, apesar da toxicidade do selênio, a selenocisteína é um componente essencial de várias proteínas de mamíferos.
- Esquematizar a reação catalisada por uma oxidase de função mista.
- Identificar o papel da tetra-hidrobiopterina na biossíntese de tirosina.
- Indicar o papel de um tRNA modificado na inserção cotradução da selenocisteína em proteína.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

As implicações médicas do material apresentado neste capítulo relacionam-se com os estados de deficiência de aminoácidos que podem ocorrer se os aminoácidos nutricionalmente essenciais estiverem ausentes na dieta ou presentes em quantidades inadequadas. Os estados de deficiência de aminoácidos endêmicos em certas regiões da África Ocidental incluem o **kwashiorkor**, que ocorre quando uma criança é desmamada e passa a ser alimentada com uma dieta rica em amido e pobre em proteínas, e o **marasmo**, caracterizado pela deficiência de aporte calórico e aminoácidos específicos. Os pacientes com síndrome do intestino curto, que são incapazes de absorver quantidades suficientes de calorias e nutrientes, apresentam anormalidades nutricionais e metabólicas significativas. Tanto o distúrbio nutricional conhecido como **escorbuto**, uma deficiência dietética de vitamina C, quanto distúrbios genéticos específicos estão associados a uma redução da capacidade do tecido conectivo de formar hidroxiprolina e hidroxilisina. A consequente instabilidade na conformação do colágeno resulta em sangramento das gengivas, edema das articulações, cicatrização deficiente de feridas e, por fim, morte. A **síndrome de Menkes**, caracterizada por cabelos enroscados e

retardo do crescimento, resulta de uma deficiência nutricional de cobre, que é um cofator essencial da lisil oxidase, enzima que atua na formação das ligações cruzadas covalentes que fortalecem as fibras de colágeno. Os distúrbios genéticos da biossíntese de colágeno incluem várias formas de **osteogênese imperfeita**, caracterizada por fragilidade óssea, e síndrome de **Ehlers–Danlos**, um grupo de distúrbios do tecido conectivo que resultam em mobilidade das articulações e anormalidades da pele, devido a defeitos nos genes que codificam enzimas, incluindo a lisil hidroxilase.

AMINOÁCIDOS NUTRICIONALMENTE ESSENCIAIS E NUTRICIONALMENTE NÃO ESSENCIAIS

Quando aplicados aos aminoácidos, os termos "essencial" e "não essencial" são incorretos, visto que todos os 20 aminoácidos comuns são essenciais para assegurar a saúde. Desses 20 aminoácidos, 8 *precisam* estar presentes na dieta humana e, por conseguinte, são mais bem designados como "*nutricionalmente essenciais*". Os outros 12 aminoácidos são "*nutricionalmente não essenciais*", visto que não precisam estar presentes na dieta (**Tabela 27-1**). A distinção entre essas duas classes de aminoácidos foi estabelecida na década de 1930, quando seres humanos foram alimentados com aminoácidos purificados em lugar de proteína. As pesquisas bioquímicas subsequentes revelaram as reações e os intermediários envolvidos na biossíntese de todos os 20 aminoácidos. Os distúrbios de deficiência de aminoácidos são endêmicos em certas regiões da África Ocidental, onde a nutrição baseia-se, em grande parte, em cereais que são pobres em triptofano e lisina. Esses distúrbios nutricionais incluem o *kwashiorkor*, que ocorre quando uma criança é desmamada e passa a ser alimentada com uma dieta a base de amido e pobre em proteínas, e o marasmo, em que há deficiência tanto de aporte calórico quanto de aminoácidos específicos.

Os aminoácidos nutricionalmente essenciais são formados por vias metabólicas longas

A existência de necessidades nutricionais sugere que a dependência de um suprimento externo de determinado nutriente pode ter maior valor de sobrevida do que a capacidade de biossintetizá-lo. Por quê? Se um nutriente específico estiver presente no alimento, um organismo capaz de sintetizá-lo irá transferir à sua progênie uma informação genética de valor de sobrevida *negativo*. O valor de sobrevida é negativo, e não nulo, visto que é necessária a presença de ATP e nutrientes para sintetizar DNA "desnecessário" – mesmo se os genes codificados específicos não forem mais expressos. O número de enzimas necessárias nas células procarióticas para sintetizar os aminoácidos nutricionalmente essenciais é grande em relação ao número de enzimas necessárias para a síntese dos aminoácidos nutricionalmente não essenciais (**Tabela 27-2**). Isso sugere uma vantagem de sobrevida na retenção da capacidade de produzir aminoácidos "fáceis", porém com perda da capacidade de produzir aminoácidos "difíceis". As vias metabólicas que formam os aminoácidos nutricionalmente essenciais ocorrem nas plantas e

TABELA 27-1 Necessidades de aminoácidos nos seres humanos

Nutricionalmente essenciais	Nutricionalmente não essenciais
Arginina[1]	Alanina
Histidina	Asparagina
Isoleucina	Aspartato
Leucina	Cisteína
Lisina	Glutamato
Metionina	Glutamina
Fenilalanina	Glicina
Treonina	Hidroxiprolina[2]
Triptofano	Hidroxilisina[2]
Valina	Prolina
	Serina
	Tirosina

[1] Nutricionalmente "semiessencial". Sintetizada em taxas inadequadas para sustentar o crescimento de crianças.
[2] Não é necessária para a síntese de proteínas, porém é formada durante o processamento pós-tradução do colágeno.

TABELA 27-2 Enzimas necessárias para a síntese de aminoácidos a partir de intermediários anfibólicos

Número de enzimas necessárias para a síntese			
Nutricionalmente essenciais		Nutricionalmente não essenciais	
Arg[1]	7	Ala	1
His	6	Asp	1
Thr	6	Asn[2]	1
Met	5 (4 compartilhadas)	Glu	1
Lys	8	Gln[1]	1
Ile	8 (6 compartilhadas)	Hyl[3]	1
Val	1 (7 compartilhadas)	Hyp[4]	1
Leu	3 (7 compartilhadas)	Pro[1]	3
Phe	10	Ser	3
Trp	5 (8 compartilhadas)	Gly[5]	1
	59	Cy[6]	2
		Tyr[7]	1
			17

[1] A partir de Glu, [2] A partir de Asp, [3] A partir de Lys, [4] A partir de Pro, [5] A partir de Ser, [6] A partir de Ser mais S^{2-}, [7] A partir de Phe.

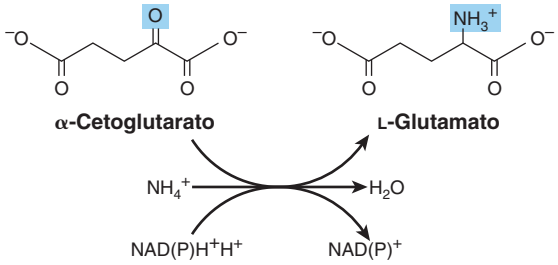


FIGURA 27-1 A reação da glutamato-desidrogenase.

nas bactérias, mas não nos seres humanos, razão pela qual não serão discutidas aqui. Este capítulo trata das reações e dos intermediários envolvidos na biossíntese dos 12 aminoácidos nutricionalmente *não essenciais* pelos tecidos humanos, bem como de distúrbios nutricionais e metabólicos selecionados associados ao seu metabolismo.

BIOSSÍNTESE DOS AMINOÁCIDOS NUTRICIONALMENTE NÃO ESSENCIAIS

Glutamato

A primeira reação na biossíntese de aminoácidos da "família do glutamato" consiste na amidação redutora do α-cetoglutarato, catalisada pela glutamato desidrogenase (**Figura 27-1**). A reação é mostrada como unidirecional, na direção da síntese de glutamato, visto que ela o favorece fortemente. Isso é fisiologicamente importante, pois o íon amônio em altas concentrações é citotóxico.

Glutamina

A amidação do glutamato a glutamina, em uma reação catalisada pela glutamina-sintetase, envolve a formação intermediária de γ-glutamil fosfato (**Figura 27-2**). Após a ligação ordenada do glutamato e ATP, o glutamato ataca o fósforo γ do ATP, formando γ-glutamil-fosfato e ATP. Em seguida, o NH_4^+ liga-se e, na forma de NH_3, ataca o γ-glutamil-fosfato, com formação de um intermediário tetraédrico. A liberação de P_i e de um próton do grupo γ-amino do intermediário tetraédrico permite, então, a liberação do produto, a glutamina.

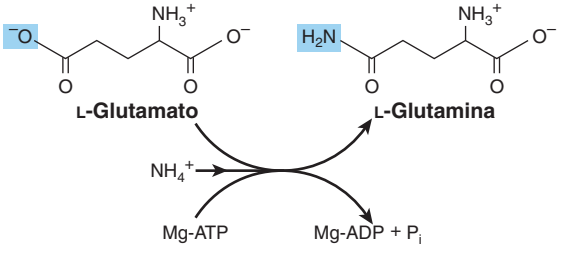


FIGURA 27-2 A reação da glutamina-sintetase.

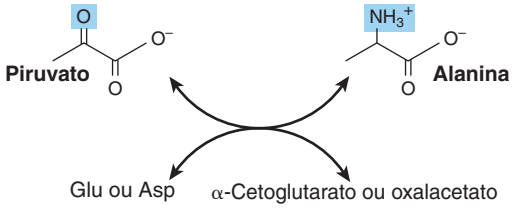


FIGURA 27-3 Formação da alanina por transaminação do piruvato. O doador de amino pode ser o glutamato ou o aspartato. Por conseguinte, o outro produto é α-cetoglutarato ou oxalacetato.

Alanina e aspartato

A transaminação do piruvato forma a alanina (**Figura 27-3**). De modo semelhante, a transaminação do oxalacetato forma o aspartato.

A glutamato-desidrogenase, a glutamina-sintetase e as aminotransferases desempenham papéis centrais na biossíntese dos aminoácidos

A ação combinada das enzimas glutamato-desidrogenase, glutamina-sintetase e aminotransferases (Figuras 27-1, 27-2 e 27-3) converte o íon amônio inorgânico no nitrogênio α-amino dos aminoácidos.

Asparagina

A conversão do aspartato em asparagina, catalisada pela asparagina-sintetase (**Figura 27-4**), assemelha-se à reação da glutamina-sintetase (Figura 27-2), porém a glutamina, e não o íon amônio, é que fornece o nitrogênio. Entretanto, as asparagina-sintetases bacterianas também podem utilizar o íon amônio. A reação envolve a formação intermediária de aspartil-fosfato. A hidrólise acoplada do PP_i a P_i pela pirofosfatase faz a reação ser fortemente favorecida.

Serina

A oxidação do grupo α-hidroxila do intermediário glicolítico 3-fosfoglicerato pela 3-fosfoglicerato-desidrogenase o converte em 3-fosfo-hidroxipiruvato. Em seguida, a transaminação e a desfosforilação subsequente formam a serina (**Figura 27-5**).

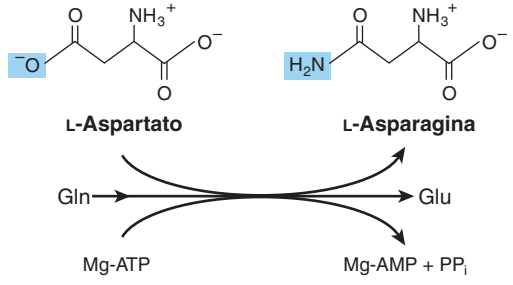


FIGURA 27-4 A reação da asparagina-sintetase. Observe as semelhanças e as diferenças com a reação da glutamina-sintetase (Figura 27-2).

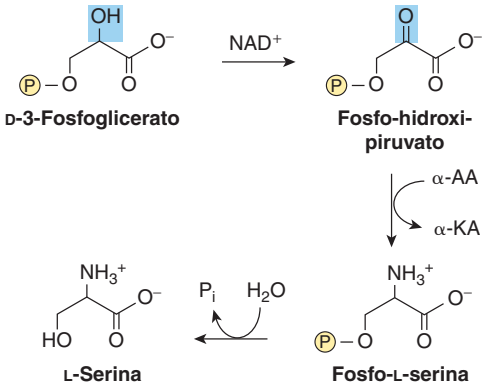


FIGURA 27-5 Biossíntese da serina. (α-AA, α-aminoácidos; α-KA, α-cetoácidos.)

Glicina

As glicina-aminotransferases podem catalisar a síntese de glicina a partir do glioxilato e glutamato ou alanina. Diferentemente da maioria das reações das aminotransferases, essas reações favorecem fortemente a síntese de glicina. Outras vias importantes para a formação de glicina nos mamíferos são a partir da colina (**Figura 27-6**) e da serina (**Figura 27-7**).

Prolina

A reação inicial na biossíntese de prolina converte o grupo γ-carboxila do grupo glutamato no anidrido ácido misto de glutamato γ-fosfato (**Figura 27-8**). A redução subsequente forma

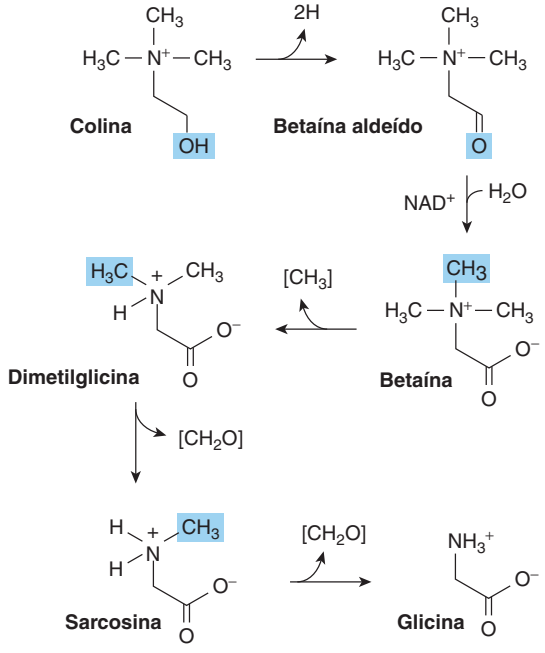


FIGURA 27-6 Formação da glicina a partir da colina. As enzimas que catalisam as reações apresentadas são a colina-desidrogenase, a betaína-desidrogenase, a betaína-homocisteína *N*-metiltransferase, a sarcosina-desmetilase e a sarcosina-oxidase, respectivamente.

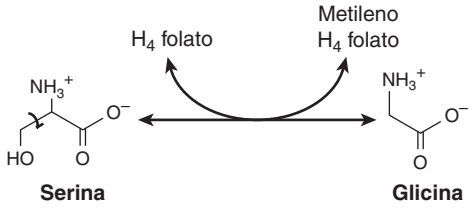


FIGURA 27-7 A reação da serina-hidroximetiltransferase. A reação é livremente reversível (H_4 folato, tetra-hidrofolato).

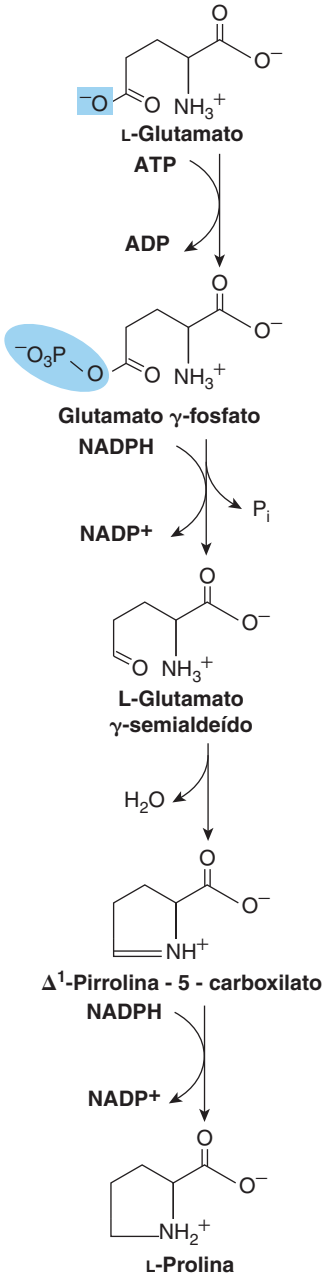


FIGURA 27-8 Biossíntese da prolina a partir do glutamato. Os catalisadores para essas reações são a glutamato-5-quinase, a glutamato-semialdeído-desidrogenase, o fechamento do anel não catalisado e a pirrolina-5-carboxilato-redutase.

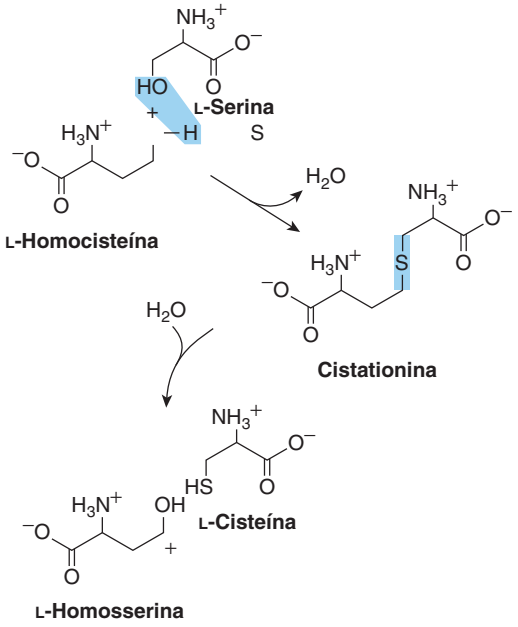


FIGURA 27-9 Conversão da homocisteína e da serina em homosserina e cisteína. O enxofre da cisteína provém da metionina, e o esqueleto de carbono, da serina.

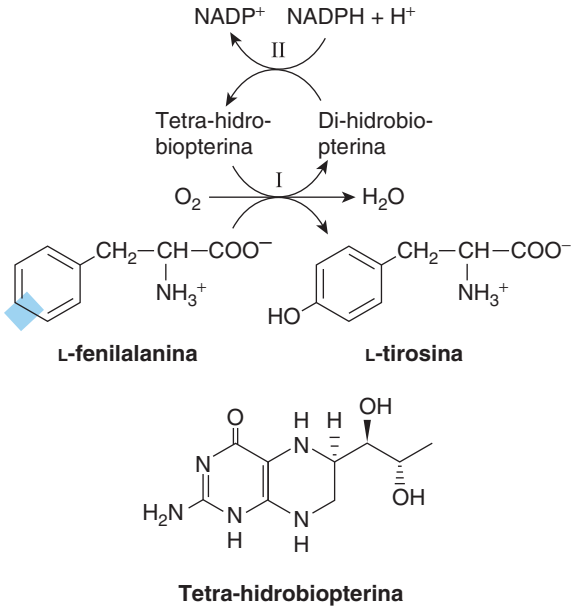


FIGURA 27-10 Reação da fenilalanina-hidroxilase. Duas atividades enzimáticas estão envolvidas. A atividade II catalisa a redução da di-hidrobiopterina pelo NADPH e a atividade I a redução de O_2 a H_2O e da fenilalanina à tirosina. Esta reação está associada a vários defeitos do metabolismo da fenilalanina discutido no Capítulo 29.

glutamato γ-semialdeído, que, após ciclização espontânea, é reduzido a γ-prolina.

Cisteína

Apesar de não ser nutricionalmente essencial, a cisteína é formada a partir da metionina, que é nutricionalmente essencial. Após conversão da metionina em homocisteína (ver Figura 29-19), a homocisteína e a serina formam a cistationina, cuja hidrólise produz cisteína e homosserina (**Figura 27-9**).

Tirosina

A fenilalanina-hidroxilase converte a fenilalanina em tirosina (**Figura 27-10**). Quando a dieta contém quantidades adequadas do aminoácido nutricionalmente essencial fenilalanina, a tirosina é nutricionalmente não essencial. Entretanto, como a reação da fenilalanina-hidroxilase é irreversível, a tirosina de origem nutricional não pode substituir a fenilalanina. A catálise por essa oxigenase de função mista incorpora um átomo de O_2 na posição *para* da fenilalanina e reduz o outro átomo a água. O poder de redução, proporcionado como tetra-hidrobiopterina, deriva, em última análise, do NADPH (Figura 27-10).

Hidroxiprolina e hidroxilisina

A hidroxiprolina e a hidroxilisina ocorrem principalmente no colágeno. Como não existe nenhum tRNA para ambos os aminoácidos-hidroxilados, nem a hidroxiprolina nem a hidroxilisina da dieta são incorporadas durante a síntese de proteína. A peptidil-hidroxiprolina e a hidroxilisina originam-se da prolina e da lisina, porém somente após a incorporação desses aminoácidos em peptídeos. A hidroxilação dos resíduos de peptidil-prolil e peptidil-lisil, catalisada pela **prolil-hidroxilase** e **lisil-hidroxilase** da pele, do músculo esquelético e das feridas em processo de granulação exige, além do substrato, O_2 molecular, ascorbato, Fe^{2+} e α-cetoglutarato (**Figura 27-11**). Para cada mol de prolina ou lisina-hidroxiladas, um mol de α-cetoglutarato é descarboxilado em succinato. As hidroxilases são oxigenases de função mista. Um átomo de O_2 é incorporado na colina ou na lisina, e o outro, no succinato (Figura 27-11). A deficiência de vitamina C, cuja presença é necessária para essas duas hidroxilases, resulta em **escorbuto**, caracterizado por sangramento das gengivas, edema das articulações e cicatrização deficiente de feridas, devido ao comprometimento da estabilidade do colágeno (ver Capítulos 5 e 48).

Valina, leucina e isoleucina

Embora a leucina, a valina e a isoleucina sejam aminoácidos nutricionalmente essenciais, as aminotransferases teciduais efetuam a interconversão reversível de todos os três aminoácidos e seus

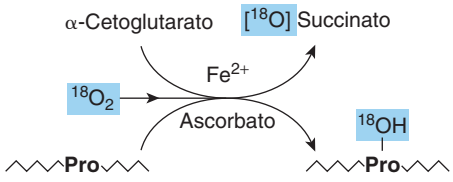


FIGURA 27-11 A reação da prolil hidroxilase. O substrato é um peptídeo rico em prolina. Durante a reação, o oxigênio molecular é incorporado tanto no succinato quanto na prolina. A lisil hidroxilase catalisa uma reação análoga.

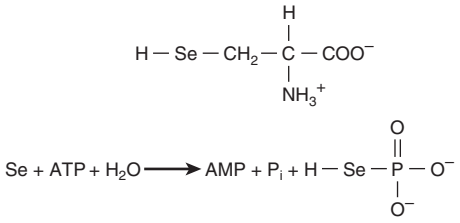


FIGURA 27-12 A selenocisteína (*em cima*) e a reação catalisada pela selenofosfato sintetase (*embaixo*).

α-cetoácidos correspondentes. Por isso, esses α-cetoácidos podem substituir seus aminoácidos na dieta.

A selenocisteína, o 21º aminoácido

Apesar de a ocorrência da selenocisteína (**Figura 27-12**) ser incomum nas proteínas, são conhecidas pelo menos 25 selenoproteínas humanas. A selenocisteína é encontrada no sítio ativo de várias enzimas humanas que catalisam reações redox. Entre os exemplos, estão incluídas a tiorredoxina-redutase, a glutationa-peroxidase e a desiodinase, a qual converte a tiroxina em tri-iodotironina. Quando presente, a selenocisteína participa no mecanismo catalítico dessas enzimas. De modo significativo, a substituição da selenocisteína pela cisteína pode, em verdade, comprometer a atividade catalítica. A ocorrência de comprometimento nas selenoproteínas humanas foi implicada na tumorigênese e na aterosclerose e está associada à miocardiopatia por deficiência de selênio (doença de Keshan).

A biossíntese da selenocisteína exige a presença de cisteína, selenato (SeO_4^{2-}), ATP, um tRNA específico e várias enzimas. A serina fornece o esqueleto de carbono para a selenocisteína. O selenofosfato, formado a partir do ATP e do selenato (Figura 27-12), atua como doador de selênio. Diferentemente da hidroxiprolina ou hidroxilisina, a selenocisteína origina-se de cotradução durante a sua incorporação em peptídeos. O anticódon UGA do tRNA incomum, denominado $tRNA^{Sec}$, normalmente sinaliza interrupção. A capacidade da maquinaria de síntese proteica de identificar um códon UGA específico de selenocisteína envolve o elemento de inserção da selenocisteína, uma estrutura em haste-alça situada na região não traduzida do mRNA. O $tRNA^{Sec}$ é inicialmente carregado com serina pela ligase que carrega o $tRNA^{Ser}$. A substituição subsequente do oxigênio da serina por selênio envolve o selenofosfato formado pela selenofosfato-sintetase (Figura 27-12). Reações sucessivas catalisadas por enzimas convertem o cisteil-$tRNA^{Sec}$ em aminoacrilil-$tRNA^{Sec}$ e, a seguir, em selenocisteil-$tRNA^{Sec}$. Na presença de um fator de alongamento específico, que reconhece o selenocisteil-$tRNA^{Sec}$, a selenocisteína pode ser então incorporada em proteínas.

RESUMO

- Todos os vertebrados podem sintetizar certos aminoácidos a partir de intermediários anfibólicos ou a partir de outros aminoácidos obtidos da dieta. Os intermediários e os aminoácidos a partir dos quais se originam são o α-cetoglutarato (Glu, Gln, Pro, Hyp), o oxalacetato (Asp, Asn) e o 3-fosfoglicerato (Ser, Gly).
- A cisteína, a tirosina e a hidroxilisina são formadas a partir de aminoácidos nutricionalmente essenciais. A serina fornece o esqueleto de carbonos, enquanto a homocisteína fornece o enxofre para a biossíntese de cisteína.
- No escorbuto, doença nutricional que resulta da deficiência de vitamina C, o comprometimento na hidroxilação da peptidil-prolina e da peptidil-lisina resulta na incapacidade de fornecer os substratos necessários para a ligação cruzada nos colágenos em maturação.
- A fenilalanina-hidroxilase converte a fenilalanina em tirosina. A reação catalisada por essa oxidase de função mista é irreversível.
- A hidroxiprolina e a hidroxilisina provenientes da dieta não são incorporadas em proteínas, visto que não há nenhum códon ou tRNA para determinar a sua inserção em peptídeos.
- A peptidil hidroxiprolina e a hidroxilisina são formadas por hidroxilação da peptidil prolina ou lisina, em reações catalisadas por oxidases de função mista que exigem a presença de vitamina C como cofator.
- A selenocisteína, um resíduo de sítio ativo essencial presente em várias enzimas dos mamíferos, surge por inserção cotradução a partir de um tRNA previamente modificado.

REFERÊNCIAS

Beckett GJ, Arthur JR: Selenium and endocrine systems. J Endocrinol 2005;184:455.

Donovan J, Copeland PR: Th e effi ciency of selenocysteine incorporation is regulated by translation initiation factors. J Mol Biol 2010;400:659.

Kilberg MS: Asparagine synthetase chemotherapy. Annu Rev Biochem 2006;75:629.

Lobanov AV, Hatfi eld DL, Gladyshev VN: Reduced reliance on the trace element selenium during evolution of mammals. Genome Biol 2008;9:R62.

Scriver CR, Sly WS, Childs B, et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill, 2001.

Stickel F, Inderbitzin D, Candinas D: Role of nutrition in liver transplantation for end-stage chronic liver disease. Nutr Rev 2008;66:47.

CAPÍTULO

28

Catabolismo das Proteínas e do Nitrogênio dos Aminoácidos

Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever a renovação das proteínas, indicar a taxa média de renovação das proteínas nos indivíduos saudáveis e fornecer exemplos de proteínas humanas que são degradadas em taxas maiores do que a média.
- Descrever os eventos na renovação das proteínas por ambas as vias dependente e independente de ATP, bem como os papéis na degradação proteica da ubiquitina, nos receptores de superfície celular, nas assialoglicoproteínas circulantes e nos lisossomos.
- Indicar como os produtos finais do catabolismo do nitrogênio nos mamíferos diferem daqueles das aves e dos peixes.
- Ilustrar os papéis centrais das transaminases (aminotransferases), da glutamato-desidrogenase e da glutaminase no metabolismo do nitrogênio nos seres humanos.
- Utilizar fórmulas estruturais para representar as reações que convertem em ureia a NH_3, o CO_2 e o nitrogênio amida do aspartato.
- Indicar as localizações subcelulares das enzimas que catalisam a biossíntese da ureia, bem como os papéis da regulação alostérica e do acetilglutamato na regulação desse processo.
- Explicar por que defeitos metabólicos em diferentes enzimas da biossíntese da ureia, apesar de distintos em nível molecular, apresentam sinais e sintomas clínicos semelhantes.
- Descrever as abordagens clássicas e o papel da espectrometria de massa em *tandem* na triagem de recém-nascidos para doenças metabólicas hereditárias.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Este capítulo descreve como o nitrogênio dos aminoácidos é convertido em ureia, bem como os raros distúrbios metabólicos que acompanham defeitos na biossíntese da ureia.

Dessa forma, os tecidos convertem a amônia no nitrogênio amida do aminoácido não tóxico, a glutamina.

Se houver comprometimento da função hepática, como as que ocorrem na cirrose e na hepatite, a presença de níveis sanguíneos elevados de amônia produz sinais e sintomas clínicos. Cada enzima do ciclo da ureia fornece exemplos de defeitos metabólicos e de suas consequências fisiológicas, e o ciclo, em sua totalidade, serve como modelo molecular para o estudo dos defeitos metabólicos humanos.

A RENOVAÇÃO DAS PROTEÍNAS OCORRE EM TODAS AS FORMAS DE VIDA

O contínuo processo de degradação e síntese (renovação) das proteínas celulares ocorre em todas as formas de vida. Ocorrem altas taxas de degradação proteica nos tecidos que sofrem rearranjo estrutural, como, por exemplo, o tecido uterino durante a gravidez, o músculo esquelético em situações de jejum prolongado e o tecido da cauda do girino durante a metamorfose. A principal porção dos esqueletos de carbono dos aminoácidos é convertida em intermediários anfibólicos, ao passo que, nos seres humanos.

AS PROTEASES E AS PEPTIDASES DEGRADAM AS PROTEÍNAS EM AMINOÁCIDOS

. As meias-vidas das proteínas hepáticas variam de menos de As que consistem em regiões ricas em prolina (P), glutamato (E), serina (S) e treonina (T). As proteases intracelulares hidrolisam as ligações peptídicas internas. Os peptídeos resultantes são então degradados em aminoácidos por endopeptidases, que clivam ligações peptídicas internas, e por aminopeptidases e carboxipeptidases, que removem sequencialmente os aminoácidos a partir das extremidades aminoterminal e carboxiterminal, respectivamente.

Degradação independente de ATP

As proteínas extracelulares associadas à membrana e as intracelulares de longa vida são degradadas nos lisossomos por processos independentes do ATP.

Degradação dependente de ATP e ubiquitina

. A **ubiquitina**, assim denominada por estar presente em todas as células eucarióticas, é um pequeno polipeptídeo (8,5 kDa, 76 resíduos) que A estrutura primária da ubiquitina é altamente conservada. Apenas três dos 76 resíduos diferem entre a ubiquitina de levedura e a ubiquitina humana. As moléculas de ubiquitina estão unidas por (**Figura 28-1**). O resíduo presente na extremidade aminoterminal afeta o modo pelo qual uma proteína é ubiquitinada. . A ligação de uma única molécula de ubiquitina a proteínas transmembranas altera a sua localização subcelular e as tornam alvos de degradação. (ver Capítulo 46). Pela descoberta do processo de degradação das proteínas mediada pela ubiquitina, Aaron Ciechanover, Avram Hershko, de Israel, e Irwin Rose, dos EUA, receberam o prêmio

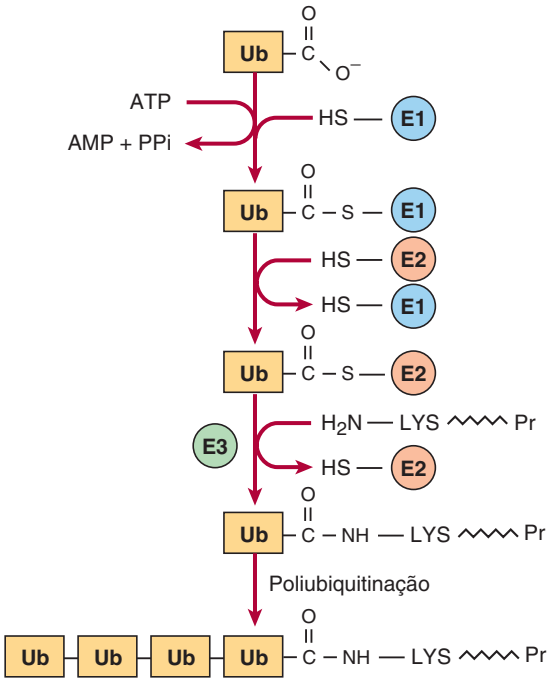


FIGURA 28-1 Reações envolvidas na fixação da ubiquitina (Ub) às proteínas. Existem três enzimas envolvidas. A E1 é uma enzima ativadora, a E2, uma ligase e a E3, uma transferase. Embora sejam indicadas como entidades únicas, existem vários tipos de E1 e mais de 500 tipos de E2. O COOH terminal da ubiquitina forma inicialmente um tioéster. A hidrólise acoplada do PP_i pela pirofosfatase assegura a rápida ocorrência da reação. Ciclos adicionais de ubiquitinação resultam em poliubiquitinação subsequente.

Nobel de química de 2004. As doenças metabólicas associadas a defeitos de ubiquitinação incluem a síndrome de Angelman e a síndrome de Hippel–Lindau, na qual existe um defeito na ubiquitina E3 ligase. Para aspectos adicionais da degradação proteica e da ubiquitinação, incluindo seu papel no ciclo celular, ver os Capítulos 4 e 46.

A TROCA ENTRE ÓRGÃOS MANTÉM OS NÍVEIS CIRCULANTES DE AMINOÁCIDOS

A manutenção das concentrações de aminoácidos no plasma circulante, no estado de equilíbrio dinâmico entre as refeições, depende do equilíbrio efetivo entre a liberação das reservas endógenas de proteínas e a sua utilização por vários tecidos.

A **Figura 28-2** fornece um resumo do estado pós-absortivo.

A alanina é um **aminoácido gliconeogênico** essencial (**Figura 28-3**). A taxa de gliconeogênese hepática a partir da alanina é muito maior do que a de todos os outros aminoácidos. A

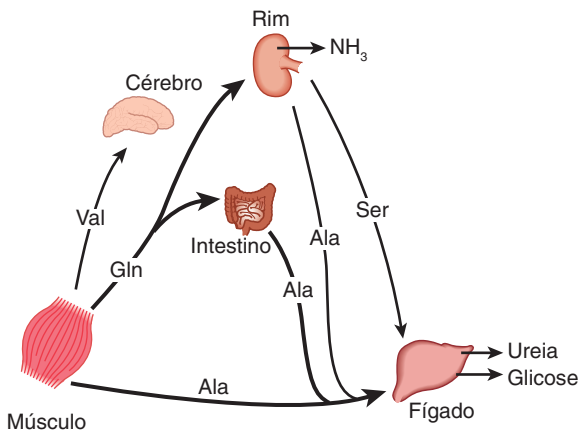


FIGURA 28-2 Troca de aminoácidos entre órgãos em seres humanos normais no estado pós-absortivo. A figura mostra o papel essencial da alanina no débito de aminoácidos do músculo e do intestino e sua captação pelo fígado.

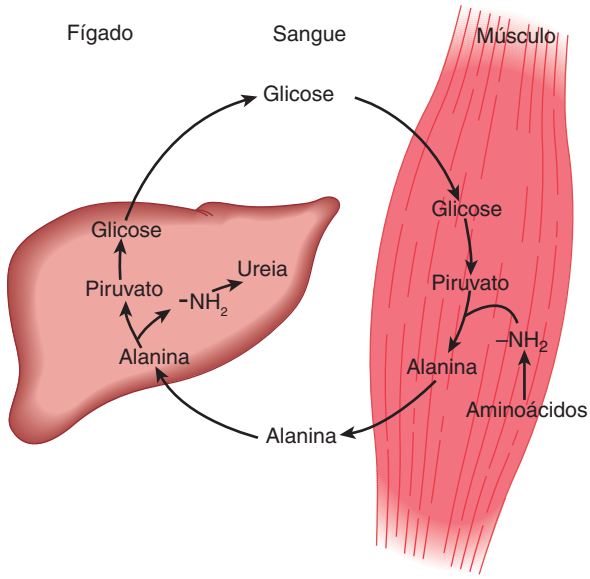


FIGURA 28-3 O ciclo de glicose-alanina. A alanina é sintetizada no músculo por transaminação do piruvato derivado da glicose, liberada na corrente sanguínea e captada pelo fígado. No fígado, o esqueleto de carbono da alanina é novamente convertido em glicose, que é liberada na corrente sanguínea, onde fica disponível para a captação pelo músculo e para nova síntese de alanina.

capacidade de gliconeogênese do fígado a partir da alanina só atinge a saturação quando a concentração de alanina alcança 20 a 30 vezes o seu nível fisiológico normal. Depois de uma refeição rica em proteína, os tecidos esplâncnicos liberam aminoácidos (**Figura 28-4**), enquanto os músculos periféricos extraem aminoácidos, predominantemente os de cadeia ramificada em ambos os casos. Por conseguinte, os aminoácidos de cadeia ramificada desempenham um papel especial no metabolismo do nitrogênio: em jejum, quando fornecem ao cérebro uma fonte de energia, e no estado alimentado, quando são extraídos predominantemente pelo músculo, após terem sido preservados pelo fígado.

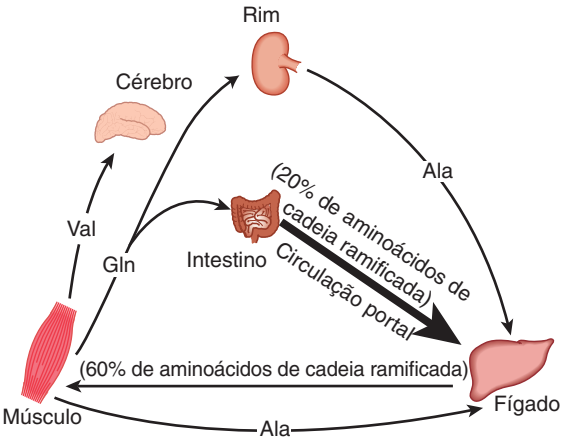


FIGURA 28-4 Resumo da troca de aminoácidos entre os órgãos imediatamente após a ingestão de alimentos.

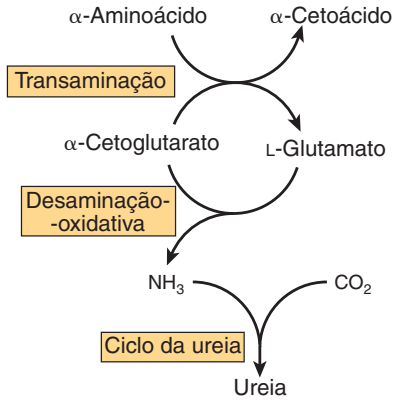


FIGURA 28-5 Fluxo global de nitrogênio no catabolismo dos aminoácidos.

OS ANIMAIS CONVERTEM O NITROGÊNIO α-AMINO EM PRODUTOS FINAIS VARIADOS

Dependendo de seu nicho ecológico e de sua fisiologia, os diferentes tipos de animais excretam o excesso de nitrogênio na forma de . O ambiente aquoso dos peixes teleósteos, os quais são **amoniotélicos** (que excretam amônia), permite que eles excretem água continuamente para facilitar a excreção de amônia, que é altamente tóxica. Enquanto esse mecanismo é apropriado para um animal aquático, as aves precisam conservar a água e manter o seu baixo peso. As aves, que são **uricotélicas**, resolvem ambos os problemas com a excreção de ácido úrico rico em nitrogênio (ver Figura 33-11) na forma de guano semissólido. Muitos animais terrestres, incluindo os seres humanos, são **ureotélicos** e excretam ureia altamente hidrossolúvel e atóxica. Como a ureia não é tóxica para os seres humanos, a presença de níveis sanguíneos elevados na doença renal constitui uma consequência, e não uma causa, de comprometimento da função renal.

BIOSSÍNTESE DA UREIA

(**Figura 28-5**). O uso de sondas de DNA complementar demonstrou que, no fígado, a expressão dos RNA para todas as enzimas do ciclo da ureia aumenta várias vezes no jejum prolongado.

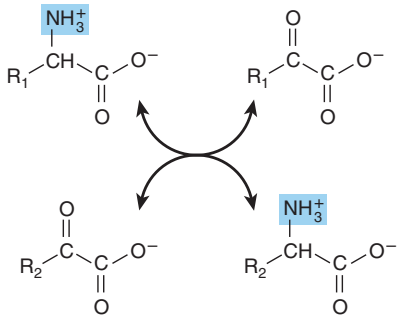


FIGURA 28-6 Transaminação. A reação é livremente reversível, com uma constante de equilíbrio próximo à unidade.

A transaminação transfere o nitrogênio α-amino para o α-cetoglutarato, formando glutamato

As reações de transaminação efetuam a interconversão de pares de α-aminoácidos e α-cetoácidos (**Figura 28-6**). As reações de transaminação, livremente reversíveis, também atuam na biossíntese de aminoácidos (ver Figura 27-3). Todos os aminoácidos comuns, com a exceção da lisina, treonina, prolina e hidroxiprolina, participam da transaminação, a qual não se restringe aos grupos α-amino. O grupo δ-amino da ornitina (mas não o grupo ε-amino da lisina) sofre prontamente transaminação.

A alanina-piruvato aminotransferase (alanina aminotransferase) e a glutamato-α-cetoglutarato aminotransferase (glutamato aminotransferase) catalisam a transferência de grupos amino para o piruvato (com formação de alanina) ou para o α-cetoglutarato (com formação de glutamato) (**Figura 28-7**).

Cada aminotransferase é específica para um par de substratos, porém inespecífica para o outro par. Como a alanina também é um substrato da glutamato aminostransferase, o nitrogênio α-amino de todos os aminoácidos que sofrem transaminação pode ser concentrado em glutamato. Esse aspecto é importante, visto que o L-glutamato é o único aminoácido que sofre desaminação oxidativa em uma taxa apreciável nos tecidos dos mamíferos. Por isso, a formação de amônia a partir de grupos α-amino ocorre principalmente pelo nitrogênio α-amino do L-glutamato.

A transaminação ocorre por um mecanismo em "pingue-pongue", caracterizado pela adição alternada de um substrato e pela liberação de um produto (Figura 28-7). Após a remoção de seu nitrogênio α-amino por transaminação, o "esqueleto" de carbono remanescente de um aminoácido é degradado por vias discutidas no Capítulo 29. Conforme assinalado anteriormente, certas doenças estão associadas a níveis séricos elevados de aminotransferases (ver Tabela 7-2).

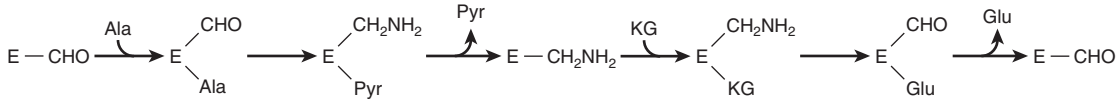


FIGURA 28-7 Mecanismo em pingue-pongue para a transaminação. E—CHO e E—CH_2NH_2 representam o pirodoxal-fosfato e a piridoxamina-fosfato ligados à enzima, respectivamente. (Ala, alanina; Glu, glutamato; KG, α-cetoglutarato; Pir, piruvato.)

O piridoxal-fosfato (PLP), um derivado da vitamina B_6 (ver Figura 44-12), é encontrado no sítio catalítico de todas as aminotransferases e desempenha um papel fundamental na catálise. Durante a transaminação, o PLP atua como "carreador" de grupos amino. Ocorre formação de uma base de Schiff ligada à enzima (**Figura 28-8**) entre o grupo oxo do PLP ligado à enzima e o grupo α-amino de um α-aminoácido. A base de Schiff pode sofrer rearranjo de várias maneiras. Na transaminação, o rearranjo forma um α-cetoácido e uma piridoxamina-fosfato ligada à enzima. Conforme observado anteriormente, certas doenças estão associadas a níveis séricos elevados de aminotransferases (ver Tabela 7-2).

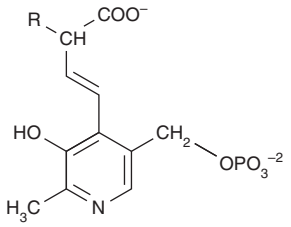


FIGURA 28-8 Estrutura de uma base de Schiff formada entre o piridoxal fosfato e o aminoácido.

A L-GLUTAMATO-DESIDROGENASE OCUPA UMA POSIÇÃO CENTRAL NO METABOLISMO DO NITROGÊNIO

A transferência do nitrogênio amino para o α-cetoglutarato forma L-glutamato.

(**Figura 28-9**).

As aminoácidos-oxidases removem o nitrogênio na forma de amônia

Embora a sua importância fisiológica seja incerta, as L-aminoácidos-oxidases do fígado e do rim convertem um aminoácido em um α-iminoácido, que sofre decomposição em α-cetoácido, com liberação de um íon amônio (**Figura 28-10**). A flavina reduzida é reoxidada pelo oxigênio molecular, formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que, em seguida, é clivado em O_2 e H_2O pela **catalase**.

A intoxicação pela amônia é potencialmente fatal

A amônia produzida pelas bactérias entéricas e absorvida no sangue venoso portal, assim como aquela produzida pelos tecidos são rapidamente removidas da circulação pelo fígado e convertidas em ureia. Desse modo, normalmente existem apenas traços de amônia (10 a 20 μg/dL) no sangue periférico. Esse processo de remoção é essencial, visto que a amônia é tóxica para o sistema nervoso central. Se o sangue portal deixa de passar pelo fígado, os níveis sanguíneos sistêmicos de amônia podem alcançar níveis tóxicos. Essa situação é observada em caso de grave comprometimento da função hepática ou de desenvolvimento de ligações colaterais entre as veias porta e sistêmicas na cirrose. Os sintomas de **intoxicação por amônia** consistem em tremor, fala arrastada, visão embaçada, coma e, por fim, morte. A amônia pode ser tóxica para o cérebro, em parte devido à sua reação com α-cetoglutarato, formando glutamato. A consequente depleção dos níveis de α-cetoglutarato compromete, então, a função do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ATC) nos neurônios.

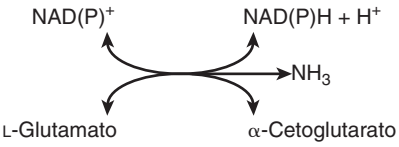


FIGURA 28-9 A reação da L-glutamato desidrogenase. O $NAD(P)^+$ significa que o NAD^+ ou o $NADP^+$ podem atuar como oxidorredutores. A reação é reversível, porém favorece a formação de glutamato.

A glutamina-sintase fixa a amônia na forma de glutamina

A formação de glutamina é catalisada pela **glutamina-sintase** mitocondrial (**Figura 28-11**). Como a síntese de ligações amida está acoplada com a hidrólise de ATP em ADP e P_i, a reação favorece fortemente a síntese de glutamina. Durante a catálise, o glutamato ataca o grupo γ-fosforil do ATP, formando γ-glutamil fosfato e ADP. Após a desprotonação do NH_4^+, a NH_3 ataca o γ-glutamil-fosfato, e ocorre liberação de glutamina e P_i. Além de fornecer glutamina para atuar como carreador de nitrogênio, carbono e energia entre os órgãos (Figura 28-2), a glutamina-sintase desempenha um importante papel na desintoxicação da amônia e na homeostasia acidobásica. Uma rara deficiência de glutamina

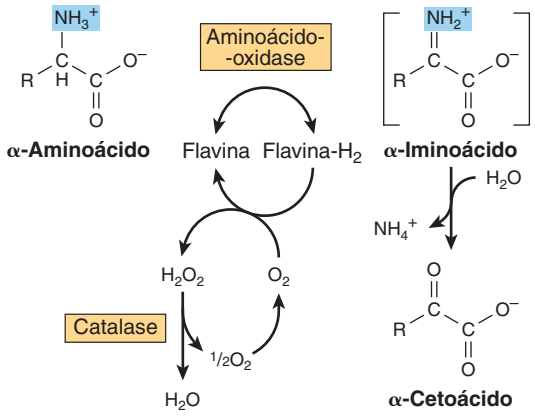


FIGURA 28-10 Desaminação oxidativa catalisada pela L-aminoácido-oxidase (L-α-aminoácido: O_2 oxidorredutase). O α-iminoácido, mostrado entre colchetes, não é um intermediário estável.

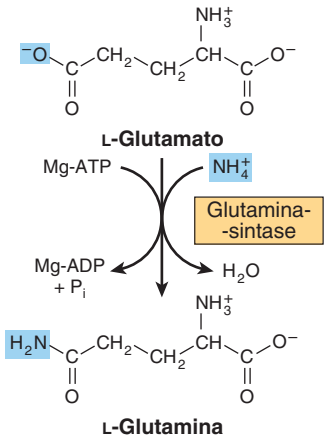


FIGURA 28-11 A reação da glutamina sintase favorece fortemente a síntese de glutamina.

sintase no recém-nascido resulta em grave lesão cerebral, falência múltipla de órgãos e morte.

A glutaminase e a asparaginase desamidam a glutamina e a asparagina

Existem duas isoformas humanas de glutaminase mitocondrial, denominadas glutaminase tipo hepático e glutaminase tipo renal. As glutaminases, que são produtos de diferentes genes, diferem no que concerne à sua estrutura, à sua cinética e à sua regulação. Os níveis de glutaminase hepática aumentam em resposta a um elevado aporte de proteína, enquanto a glutaminase tipo renal aumenta na acidose metabólica. A liberação hidrolítica do nitrogênio amida da glutamina na forma de amônia, em uma reação catalisada pela **glutaminase** (**Figura 28-12**), favorece fortemente a formação de glutamato. Uma reação análoga é catalisada pela L-asparaginase. Nestas condições, a ação combinada da glutamina-sintase e da glutaminase catalisa a interconversão do íon amônio livre e da glutamina.

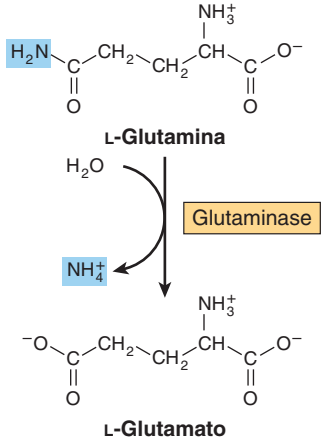


FIGURA 28-12 A reação da glutaminase prossegue de modo essencialmente irreversível na direção da formação de glutamato e NH_4^+. Observe que o nitrogênio *amida*, e não o nitrogênio α-amino, é removido.

A formação e a secreção de amônia mantêm o equilíbrio acidobásico

A excreção da amônia produzida pelas células tubulares renais na urina facilita a conservação de cátions e a regulação do equilíbrio acidobásico. A produção de amônia a partir dos aminoácidos renais intracelulares, particularmente a glutamina, aumenta na **acidose metabólica** e diminui na **alcalose metabólica**.

A UREIA É O PRINCIPAL PRODUTO FINAL DO CATABOLISMO DO NITROGÊNIO NOS SERES HUMANOS

A síntese de 1 mol de ureia requer 3 mols de ATP, 1 mol de íon amônio e 1 mol de aspartato e utiliza cinco enzimas (**Figura 28-13**). Dos seis aminoácidos que participam do processo, o *N*-acetilglutamato atua exclusivamente como ativador enzimático. Os outros servem como carreadores dos átomos que irão finalmente formar a ureia. Nos mamíferos, o principal papel metabólico da **ornitina**, da **citrulina** e do **argininossuccinato** consiste na síntese de ureia, o qual é um processo cíclico. Enquanto o íon amônio, o CO_2, o ATP e o aspartato são consumidos, a ornitina consumida na reação 2 é regenerada na reação 5. Então, não há perda nem ganho efetivo de ornitina, citrulina, argininossuccinato ou arginina. Algumas reações da síntese de ureia ocorrem na matriz das mitocôndrias, enquanto outras reações prosseguem no citosol (Figura 28-13).

A carbamoil-fosfato-sintase I inicia a biossíntese da ureia

A condensação do CO_2, da amônia e do ATP para formar **carbamoil-fosfato** é catalisada pela **carbamoil-fosfato-sintase I** mitocondrial. Uma forma citosólica dessa enzima, a carbamoil-fosfato-sintase II, utiliza glutamina em lugar de amônia como doador de nitrogênio e atua na biossíntese de pirimidinas (ver Figura 33-9). Por conseguinte, a ação combinada da glutamato-desidrogenase e da carbamoil-fosfato-sintase I transporta em ambas as direções o nitrogênio-amino para o carbamoil-fosfato, um composto com alto potencial de transferência de grupo.

A carbamoil-fosfato-sintase I, a enzima limitadora de velocidade do ciclo da ureia, só é ativa na presença de ***N*-acetilglutamato**, um ativador alostérico que aumenta a afinidade da sintase pelo ATP. A síntese de 1 mol de carbamoil-fosfato requer 2 mols de ATP. Um ATP serve como doador de fosforil para a formação da ligação anidrido ácido misto do carbamoil-fosfato. O segundo ATP fornece a força motriz para a síntese da ligação amida do carbamoil-fosfato. Os outros produtos consistem em 2 mols de ADP e 1 mol de P_i (reação 1, Figura 28-13). A reação prossegue de modo sequencial. A reação do bicarbonato com o ATP forma carbonil-fosfato e ADP. Em seguida, a amônia desloca o ADP, formando carbamato e ortofosfato. A fosforilação do carbamato pelo segundo ATP forma então carbamoil-fosfato.

A combinação de carbamoil-fosfato com a ornitina forma a citrulina

A **L-ornitina-transcarbamoilase** catalisa a transferência do grupo carbamoil do carbamoil-fosfato para a ornitina, com formação de citrulina e ortofosfato (reação 2, Figura 28-13). Enquanto a reação ocorre na matriz mitocondrial, tanto a formação de ornitina quanto o metabolismo subsequente da citrulina ocorrem no citosol. Dessa forma, a entrada de ornitina nas mitocôndrias e a saída da citrulina das mitocôndrias envolvem permeases da membrana mitocondrial interna (Figura 28-13).

A combinação de citrulina com o aspartato forma argininossuccinato

A **argininossuccinato-sintase** liga o aspartato e a citrulina pelo grupo amino do aspartato (reação 3, Figura 28-13) e proporciona o segundo nitrogênio da ureia. Essa reação requer a presença de ATP e envolve a reação intermediária de citrulil-AMP. O deslocamento subsequente do AMP pelo aspartato forma então o argininossuccinato.

A clivagem do argininossuccinato forma arginina e fumarato

A clivagem do argininossuccinato é catalisada pela **argininossuccinato-liase**. A reação prossegue com retenção de todos os três nitrogênios na arginina e com liberação do esqueleto do aspartato na forma de fumarato (reação 4, Figura 28-13). A adição subsequente de água ao fumarato forma o L-malato, cuja oxidação subsequente dependente de NAD^+ forma o oxalacetato. Essas duas reações são análogas às reações do ciclo do ácido cítrico (ver Figura 17-3), porém são catalisadas pela **fumarase** e **malato desidrogenase *citosólicas***. A transaminação do oxalacetato pela

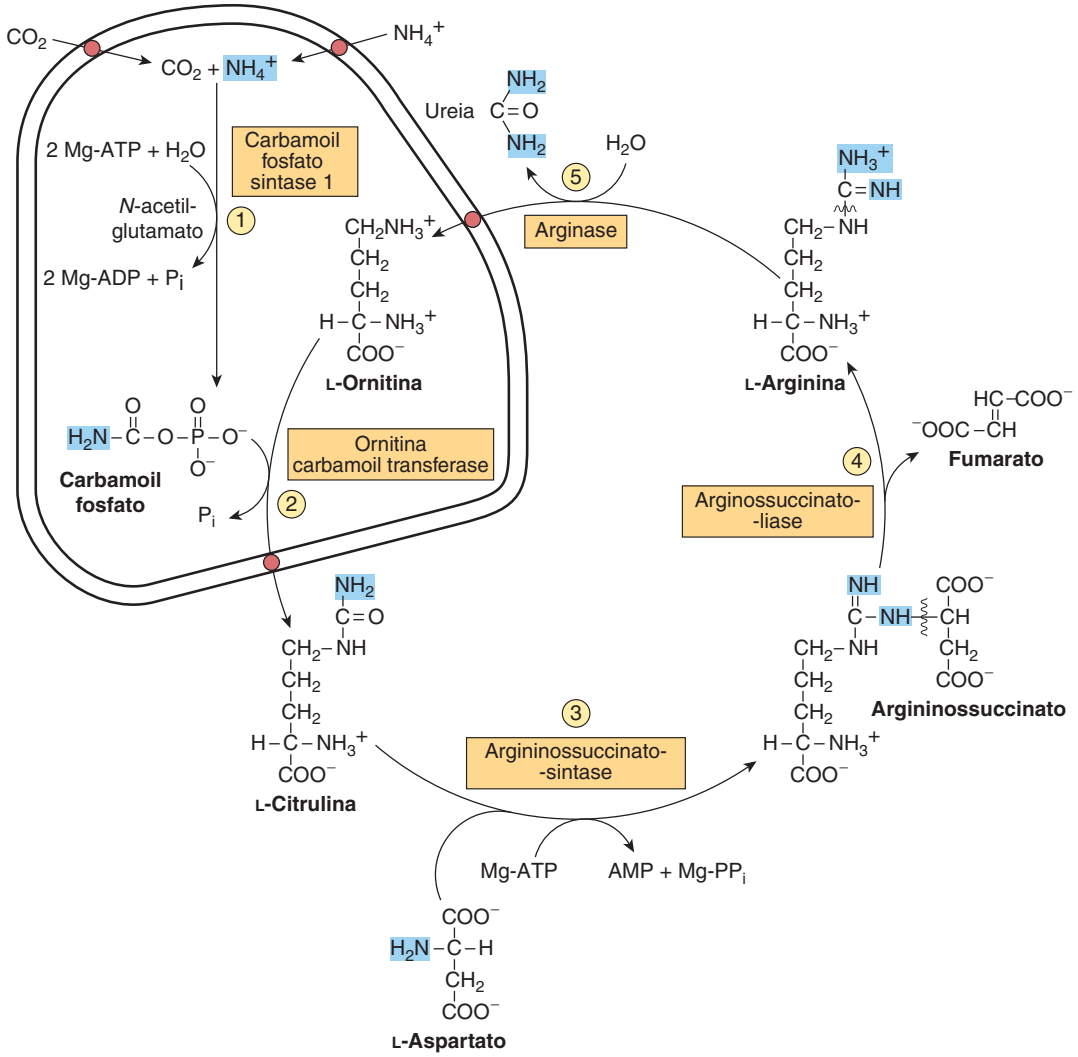


FIGURA 28-13 Reações e intermediários da biossíntese da ureia. Os grupos contendo nitrogênio que contribuem para a formação da ureia estão sombreados. As reações ① e ② ocorrem na matriz das mitocôndrias hepáticas, enquanto as reações ③, ④ e ⑤ ocorrem no citosol do fígado. O CO_2 (na forma de bicarbonato), o íon amônio, a ornitina e a citrulina entram na matriz mitocondrial por meio de carreadores específicos (ver círculos vermelhos) presentes na membrana interna das mitocôndrias hepáticas.

glutamato-aminotransferase forma novamente aspartato. Portanto, o esqueleto de carbono do aspartato-fumarato atua como carreador do nitrogênio do glutamato em um precursor da ureia.

A clivagem da arginina libera ureia e forma novamente ornitina

A clivagem hidrolítica do grupo guanidino da arginina, catalisada pela **arginase** hepática, libera ureia (reação 5, Figura 28-13). O outro produto, a ornitina, entra novamente nas mitocôndrias hepáticas e participa de ciclos adicionais de síntese de ureia. A ornitina e a lisina são potentes inibidores da arginase e competem com a arginina. A arginina também atua como precursor do potente relaxante muscular, o óxido nítrico (NO), em uma reação dependente de Ca^{2+} catalisada pela NO sintase (ver Figura 49-15).

A carbamoil-fosfato-sintase I é a enzima marca-passo do ciclo da ureia

A atividade da carbamoil-fosfato-sintase I é determinada pelo *N*-acetilglutamato, cujo nível no estado de equilíbrio dinâmico é determinado pelo equilíbrio entre a sua taxa de síntese, a partir de acetil-CoA e glutamato, e a sua taxa de hidrólise a acetato e glutamato, em reações catalisadas pela *N*-acetilglutamato sintase (NAGS) e *N*-acetilglutamato hidrolase, respectivamente.

$$\text{Acetil-CoA} + \text{L-glutamato} \rightarrow \textit{N}\text{-acetil-L-glutamato} + \text{CoASH}$$

$$\textit{N}\text{-acetil-L-glutamato} + H_2O \rightarrow \text{L-glutamato} + \text{acetato}$$

Mudanças importantes na dieta podem aumentar em 10 a 20 vezes as concentrações das enzimas individuais do ciclo da ureia. Por exemplo, o jejum prolongado eleva os níveis enzimáticos, presumivelmente para lidar com a produção aumentada de amônia que acompanha o aumento da degradação proteica induzido pelo jejum prolongado.

CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS DISTÚRBIOS METABÓLICOS

Os distúrbios metabólicos comparativamente raros, porém bem caracterizados e clinicamente devastadores, associados às enzimas da biossíntese da ureia ilustram os seguintes princípios gerais das doenças metabólicas hereditárias.

1. Sinais e sintomas clínicos semelhantes ou idênticos podem caracterizar várias mutações genéticas em um gene que codifica determinada enzima ou em enzimas que catalisam reações sucessivas de uma via metabólica.
2. A terapia racional baseia-se na compreensão das reações bioquímicas relevantes catalisadas por enzimas tanto nos indivíduos normais quanto naqueles acometidos.
3. A identificação de intermediários e de produtos derivados que se acumulam antes de um bloqueio metabólico fornece a base para testes de triagem metabólicos que podem revelar a reação que está comprometida.
4. O diagnóstico definitivo envolve um ensaio quantitativo da atividade da enzima com suspeita de deficiência.
5. A sequência de DNA do gene que codifica determinada enzima mutante é comparada com a do gene de tipo selvagem para identificar a(s) mutação(ões) específica(s) que causa(m) a doença.
6. O aumento exponencial no sequenciamento do DNA dos genes humanos identificou dezenas de mutações de um gene afetado, as quais são benignas ou estão associadas a sintomas de gravidade variável de determinado distúrbio metabólico.

CADA UMA DAS REAÇÕES DO CICLO DA UREIA ESTÁ ASSOCIADA A DISTÚRBIOS METABÓLICOS

Foram descritos defeitos em cada enzima do ciclo da ureia. Muitas das mutações causadoras foram mapeadas, e foram identificados defeitos específicos nas enzimas codificadas. Cinco doenças bem documentadas estão associadas a defeitos na biossíntese das enzimas do ciclo da ureia. A análise genética molecular localizou os *loci* das mutações associadas a cada deficiência, e cada uma delas exibe consideráveis variabilidades genética e fenotípica (**Tabela 28-1**).

Os distúrbios associados ao ciclo da ureia caracterizam-se por hiperamonemia, encefalopatia e alcalose respiratória. Quatro das cinco doenças metabólicas, as deficiências de carbamoil-fosfato-sintase, de ornitina-carbamoil-transferase, de argininossuccinato-sintase e de argininossuccinato-liase, resultam em acúmulo de precursores da ureia, principalmente amônia e glutamina. A intoxicação da amônia é mais grave quando o bloqueio metabólico ocorre nas reações 1 ou 2 (Figura 28-13), visto que, se houver síntese de citrulina, alguma amônia já é removida pela sua ligação covalente a um metabólito orgânico.

Os sintomas clínicos compartilhados por todos os distúrbios do ciclo da ureia consistem em vômitos, evitação de alimentos ricos em proteínas, ataxia intermitente, irritabilidade, letargia e retardo mental grave. A apresentação clínica mais notável é observada em lactentes a termo, que inicialmente têm aparência normal, mas que, em seguida, exibem letargia progressiva, hipotermia e apneia, devido aos níveis plasmáticos elevados de amônia. As manifestações clínicas e o tratamento de todos os cinco

TABELA 28-1 Enzimas dos distúrbios metabólicos hereditários do ciclo da ureia

Enzima	Número de catálogo da enzima	Referência OMIM[1]	Figura e reação
Carbamoil-fosfato-sintase	6.3.4.16	237300	28-11 ①
Ornitina carbamoil-transferase	2.1.3.3	311250	28-11 ②
Argininossuccinato-sintase	6.3.4.5	215700	28-11 ③
Argininossuccinato-liase	4.3.2.1	608310	28-11 ④
Arginase	3.5.3.1	608313	28-11 ⑤

[1]Banco de dados da herança mendeliana no homem *online* (Online Mendelian Inheritance in Man) ncbi.nlm.nih.gov/omim/

distúrbios são semelhantes. Uma dieta hipoproteica ingerida na forma de refeições pequenas e frequentes, para evitar aumentos súbitos nos níveis sanguíneos de amônia, pode ser acompanhada de melhora significativa e minimização da lesão cerebral. A terapia dietética tem por objetivo fornecer proteínas, arginina e energia suficientes para promover o crescimento e o desenvolvimento, enquanto minimiza simultaneamente as perturbações metabólicas.

Carbamoil-fosfato-sintase I

O *N*-Acetilglutamato é essencial para a atividade da carbamoil-fosfato-sintase I (reação 1, Figura 28-13). A ocorrência de defeitos na carbamoil-fosfato-sintase I é responsável pela doença metabólica relativamente rara (frequência estimada de 1:62.000) denominada "hiperamonemia tipo 1".

N-acetilglutamato-sintase

A *N*-Acetilglutamato-sintase (NAGS) catalisa, a partir do acetil-CoA e do glutamato, a formação do *N*-acetilglutamato essencial para a atividade da carbamoil-fosfato-sintase I.

L-glutamato + acetil-CoA → *N*-acetil-L-glutamato + CoASH

Embora as manifestações clínicas e as características bioquímicas da deficiência de NAGS sejam indistinguíveis daquelas observadas em um defeito da carbamoil-fosfato-sintase I, a deficiência de NAGS pode responder à administração de *N*-acetilglutamato.

Ornitina-permease

A síndrome de hiperornitinemia, hiperamonemia e homocitrulinúria (**síndrome HHH**) resulta da mutação do gene ORNT1 que codifica a ornitina-permease da membrana mitocondrial. A incapacidade de importar a ornitina citosólica para a matriz mitocondrial torna o ciclo da ureia inoperante, com consequente hiperamonemia e hiperornitinemia, devido ao acúmulo concomitante de ornitina citosólica. Na ausência de seu aceptor normal (ornitina), o carbamoil-fosfato mitocondrial carbamoila a lisina em homocitrulina, resultando em homocitrulinúria.

Ornitina-transcarbamoilase

A deficiência ligada ao cromossomo X, denominada "hiperamonemia tipo 2", reflete um defeito da ornitina-transcarbamoilase (reação 3, Figura 28-13). As mães também exibem hiperamonemia e aversão por alimentos ricos em proteína. Os níveis de glutamina estão elevados no sangue, no líquido cerebrospinal e na urina, provavelmente em consequência da síntese aumentada de glutamina em resposta aos níveis elevados de amônia nos tecidos.

Argininossuccinato-sintase

Além dos pacientes que carecem de atividade detectável da argininossuccinato-sintase (reação 3, Figura 28-13), foi relatada uma elevação de 25 vezes no valor de K_m para a citrulina. Na citrulinemia resultante, os níveis de citrulina no plasma e no líquido cerebrospinal estão elevados, e ocorre excreção diária de 1 a 2 g de citrulina.

Argininossuccinato-liase

A acidúria argininosuccínica, acompanhada de níveis elevados de argininossuccinato no sangue, no líquido cerebrospinal e na urina, está associada a cabelos quebradiços em tufos (tricorrexe nodosa). São conhecidos tipos de início tanto precoce quanto tardio. O defeito metabólico reside na argininossuccinato-liase (reação 4, Figura 28-13). O diagnóstico baseia-se na determinação da atividade da argininossuccinato-liase eritrocitária, que pode ser efetuada em amostra de sangue do cordão umbilical ou em células do líquido amniótico.

Arginase

A hiperargininemia é um defeito autossômico recessivo no gene da arginase (reação 5, Figura 28-13). Diferentemente de outros distúrbios do ciclo da ureia, os primeiros sintomas de hiperargininemia geralmente não aparecem até os 2 a 4 anos de idade. Os níveis de arginina no sangue e no líquido cerebrospinal são elevados. O padrão de aminoácidos urinários, que se assemelha ao da lisinocistinúria (ver Capítulo 29), pode refletir a competição com lisina e cisteína pela arginina para reabsorção nos túbulos renais.

A análise do sangue do recém-nascido por espectrometria de massa em *tandem* pode detectar doenças metabólicas

As doenças metabólicas causadas pela ausência ou pela disfunção das enzimas metabólicas podem ser devastadoras. Entretanto, a intervenção nutricional precoce pode, em muitos casos, melhorar os efeitos adversos que de outro modo seriam inevitáveis. Assim, a detecção precoce dessas doenças metabólicas é de suma importância. Nos EUA, desde a implementação dos programas de triagem neonatal na década de 1960, todos os estados passaram a efetuar uma triagem metabólica dos recém-nascidos, embora o escopo da triagem efetuada varie entre os diferentes estados. A técnica poderosa e sensível da **espectrometria de massa em *tandem*** (ver Capítulo 4) pode, em poucos minutos, detectar mais de 40 itens analisados de importância na detecção dos distúrbios metabólicos. Nos EUA, a maioria dos estados emprega a EM em *tandem* para triagem de recém-nascidos na detecção de distúrbios metabólicos como acidemias orgânicas, aminoacidemias, distúrbios da oxidação dos ácidos graxos e defeitos das enzimas do ciclo da ureia. Entretanto, no momento atual, continua havendo diferenças significativas na cobertura dos itens analisados entre os estados. Um artigo em *Clinical Chemistry* 2006 39:315 fornece uma revisão da teoria da EM em *tandem*, a sua aplicação na detecção de distúrbios metabólicos e as situações que podem produzir resultados falso-negativos, incluindo uma extensa tabela de itens analisados detectáveis e as doenças metabólicas relevantes.

A terapia gênica pode ser promissora na correção de defeitos na biossíntese da ureia?

A terapia gênica para correção dos defeitos nas enzimas do ciclo da ureia constitui uma área de pesquisa ativa. Apesar dos resultados alentadores em modelos animais, usando um adenovírus vetor para tratamento da citrulinemia, a terapia gênica no momento atual não fornece nenhuma solução efetiva para os seres humanos.

RESUMO

- Os seres humanos degradam, diariamente, 1 a 2% das proteínas corporais em uma taxa que varia amplamente entre as proteínas e o estado fisiológico. As enzimas-chave reguladoras frequentemente apresentam meias-vidas curtas.
- As proteínas são degradadas por vias tanto dependentes quanto independentes de ATP. A ubiquitina marca muitas proteínas intracelulares para sofrer degradação. Os receptores de superfície nas células hepáticas ligam-se às assialoglicoproteínas circulantes destinadas à decomposição lisossômica e as internalizam.
- Os peixes excretam diretamente quantidades altamente tóxicas de NH_3. As aves convertem NH_3 em ácido úrico, enquanto os vertebrados superiores convertem NH_3 em ureia.
- A transaminação canaliza o nitrogênio dos aminoácidos para o glutamato. A GDH ocupa uma posição central no metabolismo do nitrogênio.
- A glutamina-sintase converte a NH_3 em glutamina atóxica. A glutaminase libera a NH_3 para uso na síntese de ureia.
- A NH_3, o CO_2 e o nitrogênio amida do aspartato fornecem os átomos da ureia.
- A síntese hepática de ureia ocorre, em parte, na matriz mitocondrial e, em parte, no citosol.
- A biossíntese da ureia é regulada por alterações dos níveis enzimáticos e pela regulação alostérica da carbamoil-fosfato sintase I pelo *N*-acetilglutamato.
- As doenças metabólicas estão associadas a defeitos em cada enzima do ciclo da ureia, da ornitina-permease associada à membrana e da NAGS.
- A espectrometria de massa em *tandem* constitui a técnica de escolha para a triagem de recém-nascidos para doenças metabólicas hereditárias.

REFERÊNCIAS

Brooks P, Fuertes G, Murray RZ, et al: Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. Biochem J 2000;346:155.

Caldovic L, Morizono H, Tuchman M: Mutations and polymorphisms in the human *N*-acetylglutamate synthase (NAGS) gene. Hum Mutat 2007;28:754.

Crombez EA, Cederbaum SD: Hyperargininemia due to liver arginase defi ciency. Mol Genet Metab 2005;84:243.

Elpeleg O, Shaag A, Ben-Shalom E, et al: *N*-acetylglutamate synthase defi ciency and the treatment of hyperammonemic encephalopathy. Ann Neurol 2002;52:845.

Garg U, Dasouki M: Expanded newborn screening of inherited metabolic disorders by tandem mass spectrometry. Clinical and laboratory aspects. Clin Biochem 2006;39:315.

Gyato K, Wray J, Huang ZJ, et al: Metabolic and neuropsychological phenotype in women heterozygous for ornithine transcarbamylase defi ciency. Ann Neurol 2004;55:80.

Häberle J, Denecke J, Schmidt E, et al: Diagnosis of *N*-acetylglutamate synthase defi ciency by use of cultured fi broblasts and avoidance of nonsense-mediated mRNA decay. J Inherit Metab Dis 2003;26:601.

Häberle J, Görg B, Rutsch F, et al: Congenital glutamine defi ciency with glutamine synthetase mutations. N Engl J Med 2005;353:1926.

Häberle J, Pauli S, Schmidt E, et al: Mild citrullinemia in caucasians is an allelic variant of argininosuccinate synthetase defi ciency (citrullinemia type 1). Mol Genet Metab 2003;80:302.

Iyer R, Jenkinson CP, Vockley JG, et al: Th e human arginases and arginase defi ciency. J Inherit Metab Dis 1998;21:86.

Pickart CM: Mechanisms underlying ubiquitination. Annu Rev Biochem 2001;70:503.

Scriver CR: Garrod's foresight; our hindsight. J Inherit Metab Dis 2001;24:93.

Scriver CR, Sly WS, Childs B, et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill, 2001.

Yi JJ, Ehlers MD: Emerging roles for ubiquitin and protein degradation in neuronal function. Pharmacol Rev 2007;59:206.

CAPÍTULO

29

Catabolismo dos Esqueletos Carbônicos dos Aminoácidos

Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Citar os principais catabólitos dos esqueletos carbônicos dos aminoácidos comuns e os principais destinos metabólicos desses catabólitos.
- Escrever uma equação para uma reação da aminotransferase (transaminase) e ilustrar o papel desempenhado pela coenzima.
- Resumir as vias metabólicas de cada um dos aminoácidos comuns e identificar as reações associadas a distúrbios metabólicos clinicamente significativos.
- Fornecer exemplos de aminoacidúrias que surgem em decorrência de defeitos na reabsorção tubular glomerular e descrever as consequências do comprometimento da absorção intestinal de triptofano.
- Explicar por que os defeitos metabólicos em diferentes enzimas envolvidas no catabolismo de um aminoácido específico podem estar associados a sinais e sintomas clínicos semelhantes.
- Descrever as implicações de um defeito metabólico da glutamato-γ-semialdeído desidrogenase no catabolismo da prolina e da 4-hidroxiprolina.
- Relatar como o nitrogênio α-amino da prolina e da lisina é removido por processos diferentes da transaminação.
- Estabelecer as analogias entre as reações que participam no metabolismo dos ácidos graxos e dos aminoácidos de cadeia ramificada.
- Identificar os defeitos metabólicos específicos na hipervalinemia, na doença da urina em xarope de bordo, na cetonúria intermitente de cadeias ramificadas, na acidemia isovalérica e na acidúria metilmalônica.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

O capítulo anterior descreveu a remoção e o destino metabólico dos átomos de nitrogênio dos L-α-aminoácidos comuns. Neste capítulo, serão considerados os destinos metabólicos dos esqueletos carbônicos resultantes desses aminoácidos. São descritos as enzimas e os intermediários formados durante a conversão dos esqueletos de carbono em intermediários anfibólicos, bem como várias doenças metabólicas ou "erros inatos do metabolismo" associados a esses processos. Embora os distúrbios do catabolismo dos aminoácidos sejam, em sua maioria, raros, se não forem tratados, eles podem resultar em lesão cerebral irreversível e mortalidade precoce. Portanto, a detecção pré-natal ou pós-natal imediata dos distúrbios metabólicos e a instituição do tratamento no momento apropriado são essenciais. A possibilidade de detectar as atividades de enzimas em culturas de células do líquido amniótico facilita o diagnóstico pré-natal por amniocentese. Atualmente, todos os estados nos EUA realizam testes de triagem nos recém-nascidos para até 30 doenças metabólicas. Esses testes incluem, entre outros, distúrbios associados a defeitos no catabolismo dos aminoácidos. Os testes de triagem mais confiáveis utilizam a espectrometria de massa em *tandem* ou sequencial para detectar, em algumas gotas de sangue do recém-nascido, catabólitos sugestivos de determinado defeito metabólico. Os metabólitos detectados identificam o defeito metabólico na forma de atividade reduzida ou ausente de determinada enzima. O tratamento consiste, basicamente, em dietas com baixo teor do aminoácido cujo catabolismo está comprometido.

Mutações nos éxons ou nas regiões reguladoras de um gene que codifica uma enzima do metabolismo de aminoácidos podem resultar em incapacidade de sintetizar essa enzima ou na síntese de uma enzima parcial ou totalmente não funcional. As mutações podem não ter nenhum efeito significativo sobre a atividade da enzima codificada. Em contrapartida, mutações que comprometem a estrutura tridimensional geral ou a estrutura de sítios catalíticos ou reguladores podem estar associadas a consequências metabólicas adversas. A baixa eficiência catalítica de uma enzima mutante pode resultar do posicionamento inadequado de resíduos envolvidos na catálise ou na ligação de um substrato, coenzima ou íon metálico. As mutações também podem comprometer a capacidade de determinadas enzimas de responder apropriadamente aos sinais que modulam sua atividade, alterando a afinidade da enzima por um regulador alostérico de atividade. Tendo em vista que diferentes mutações podem produzir efeitos semelhantes sobre qualquer um dos fatores já mencionados, várias mutações podem resultar nos mesmos sinais e sintomas clínicos. Em nível molecular, constituem, portanto, doenças moleculares distintas. Para complementar os distúrbios do metabolismo de aminoácidos discutidos neste capítulo, o leitor pode consultar trabalhos de referência sobre esse tópico, como Scriver et al., 2001.

OS AMINOÁCIDOS SÃO CATABOLIZADOS A INTERMEDIÁRIOS PARA A BIOSSÍNTESE DE CARBOIDRATOS E LIPÍDEOS

Estudos nutricionais realizados no período de 1920 a 1940, reforçados e confirmados por estudos que utilizaram aminoácidos marcados com isótopos, conduzidos de 1940 a 1950, estabeleceram a interconversão dos átomos de carbono dos lipídeos, dos carboidratos e das proteínas. Esses estudos também revelaram que todo o esqueleto carbônico de todos os aminoácidos, ou parte dele, é convertido em carboidratos (13 aminoácidos), lipídeos (um aminoácido) ou lipídeos e carboidratos (cinco aminoácidos) (**Tabela 29-1**). A **Figura 29-1** fornece uma visão geral dos aspectos globais dessas interconversões.

A TRANSAMINAÇÃO GERALMENTE INICIA O CATABOLISMO DOS AMINOÁCIDOS

A remoção do nitrogênio α-amino por transaminação, uma reação catalisada por uma aminotransferase ou transaminase (ver Figura 28-6), constitui a primeira reação catabólica de todos os aminoácidos comuns, com exceção da prolina, hidroxiprolina, treonina ou lisina. Em seguida, o esqueleto hidrocarbonado remanescente é degradado em intermediários anfibólicos, conforme ilustrado na Figura 29-1.

TABELA 29-1 Destino dos esqueletos carbônicos dos L-α-aminoácidos comuns

Convertidos em intermediários anfibólicos que formam			
Carboidratos (glicogênicos)		**Lipídeos (cetogênicos)**	**Glicogênio e lipídeos (glicogênicos e cetogênicos)**
Ala	Hyp	Leu	Ile
Arg	Met		Lys
Asp	Pro		Phe
Cys	Ser		Trp
Glu	Thr		Tyr
Gly	Val		
His			

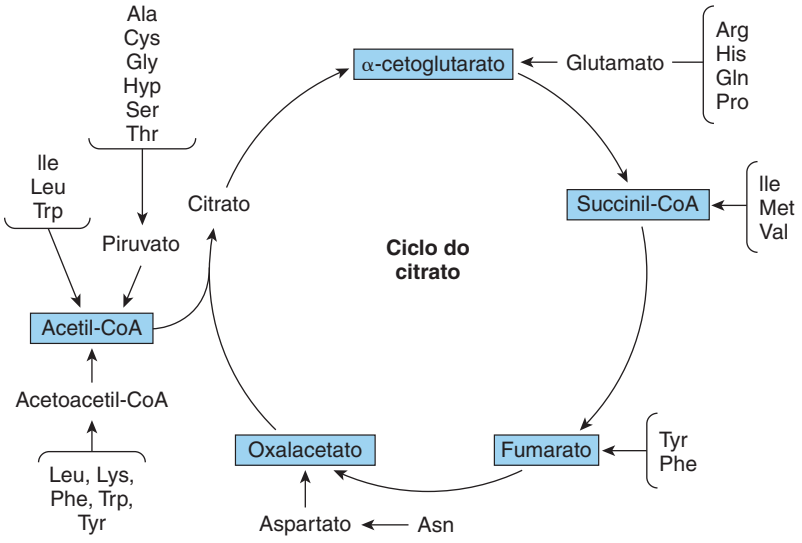


FIGURA 29-1 Visão geral dos intermediários anfibólicos que resultam do catabolismo dos aminoácidos comuns.

A asparagina e o aspartato formam oxalacetato

Todos os quatro carbonos da asparagina e do aspartato formam **oxalacetato** por meio de reações catalisadas pela **asparaginase** e por uma **transaminase** (**Figura 29-2**, parte superior). Os defeitos metabólicos nas transaminases, que desempenham funções anfibólicas centrais, podem ser incompatíveis com a vida. Consequentemente, não existe nenhum defeito metabólico conhecido associado a essa via catabólica curta.

A glutamina e o glutamato formam α-cetoglutarato

O catabolismo da glutamina e do glutamato equipara-se ao da asparagina e do aspartato, em reações catalisadas pela **glutaminase** e pela **transaminase**, formando **α-cetoglutarato** (**Figura 29-2**, parte inferior). Enquanto tanto o glutamato quanto o aspartato sejam substratos para a mesma transaminase, a desamidação de suas amidas correspondentes é catalisada por enzimas diferentes: a asparaginase e a glutaminase. Possivelmente pela razão já citada, não existe nenhum defeito metabólico conhecido da via catabólica da glutamina e do glutamato.

Entretanto, o catabolismo de muitos outros aminoácidos está associado a distúrbios metabólicos significativos. Esses distúrbios, que são discutidos adiante, com o catabolismo de cada aminoácido, estão resumidos na **Tabela 29-2**. Essa tabela fornece uma lista da enzima comprometida, seu número no catálogo de enzimas IUB, uma referência cruzada para uma figura específica e reação numerada e *link* numérico do banco de dados da *Online Mendelian Inheritance in Man* (**OMIM**).

Prolina

O catabolismo da prolina ocorre nas mitocôndrias. Como a prolina não participa da transaminação, o nitrogênio desse iminoácido é conservado durante a sua oxidação a Δ^{1}-pirrolina-5-carboxilato, abertura de seu anel pra formar glutamato-γ-semialdeído e oxidação a glutamato, sendo apenas removido durante a transaminação do glutamato em α-cetoglutarato (**Figura 29-3**). Existem dois distúrbios metabólicos do catabolismo da prolina. Ambos são herdados como traços autossômicos recessivos e são compatíveis com uma vida normal no adulto. O bloqueio metabólico na **hiperprolinemia tipo I** ocorre na **prolina-desidrogenase**. Não há nenhum comprometimento associado do catabolismo da hidroxiprolina. O bloqueio metabólico na **hiperprolinemia tipo II** afeta a **glutamato-γ-semialdeído-desidrogenase**, enzima da matriz mitocondrial que também participa no catabolismo da arginina, ornitina e hidroxiprolina (ver adiante). Como o catabolismo da prolina e da hidroxiprolina é afetado, tanto o Δ^{1}-pirrolina-5-carboxilato quanto o Δ^{1}-pirrolina-3-hidroxi-5-carboxilato são excretados (ver Figura 29-12).

Arginina e ornitina

As reações iniciais no catabolismo da arginina consistem na conversão em ornitina, seguida de transaminação da ornitina a glutamato-γ-semialdeído (**Figura 29-4**). O catabolismo subsequente do glutamato-γ-semialdeído a **α-cetoglutarato** ocorre conforme descrito para a prolina (ver Figura 29-3). A ocorrência de mutações na **ornitina δ-aminotransferase** (ornitina transaminase) provoca elevações dos níveis plasmáticos e urinários de ornitina e está associada à **atrofia convoluta da coroide e retina**. O tratamento consiste em restrição da arginina alimentar. Na **síndrome de hiperornitinemia-hiperamonemia**, um **transportador antiporte de ornitina-citrulina** mitocondrial defeituoso (ver Figura 28-13) compromete o transporte da ornitina nas mitocôndrias para uso na síntese de ureia.

Histidina

O catabolismo da histidina ocorre por meio do urocanato, 4-imidazolona-5-propionato e *N*-formiminoglutamato (Figlu). A transferência do grupo formimino para o tetra-hidrofolato forma glutamato e, em seguida, α-**cetoglutarato** (**Figura 29-5**). Na **deficiência de ácido fólico**, a transferência do grupo formimino está comprometida, e o Figlu é excretado. Desse modo, a excreção de Figlu após uma dose de histidina pode ser utilizada para detectar a deficiência de ácido fólico. Os distúrbios benignos do catabolismo da histidina incluem a **histidinemia** e a **acidúria urocânica** associada a comprometimento da **histidase**.

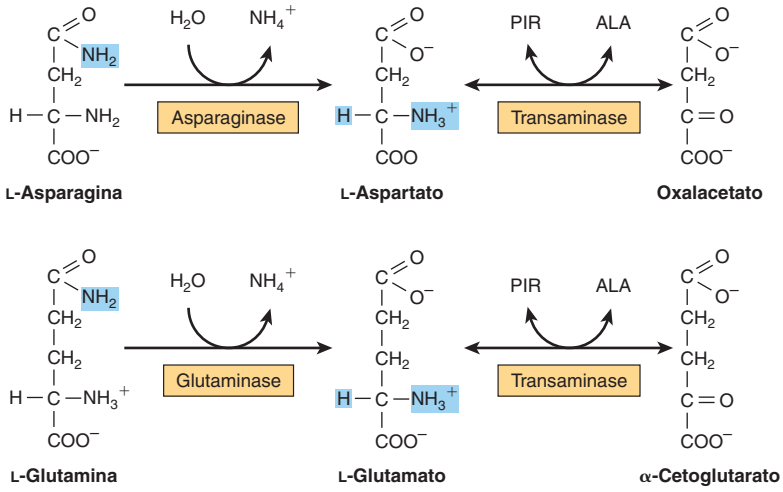


FIGURA 29-2 Catabolismo da L-asparagina (*parte superior*) e da L-glutamina (*parte inferior*) a intermediários anfibólicos. (PIR, piruvato; ALA, L-alanina.) Nesta figura e nas seguintes, a cor azul realça as porções das moléculas que sofrem alteração química.

TABELA 29-2 Doenças metabólicas do metabolismo dos aminoácidos

Enzima deficiente	Número no catálogo de enzimas	Referência OMIM[1]	Principais sinais e sintomas	Figura e reação
S-Adenosil-homocisteína-hidrolase	3.3.1.1	180.960	Hipermetioninemia	29-19 ③
Arginase	3.5.3.1	207.800	Argininemia	29-4 ①
Cistationa-β-sintase	4.2.1.22	236.200	Homocistinúria	29-19 ④
Fumarilacetoacetato-hidrolase	3.7.1.12	276.700	Tirosinemia tipo I (Tirosinose)	29-13 ④
Glicina-*N*-metiltransferase	2.1.1.20	606.664	Hipermetioninemia	29-13 ②
Histidina-amônia-liase (Histidase)	4.3.1.3	609.457	Histidinemia e acidemia urocânica	29-5 ①
Homogentisato-oxidase	1.13.11.5	607.474	Alcaptonúria. Excreção de homogentisato	29-13 ③
p-hidroxifenilpiruvato-hidroxilase	1.13.11.27	276.710	Tirosinemia neonatal	29-13 ②
Isovaleril-CoA-desidrogenase	1.3.99.10	607.036	Acidemia isovalérica	29-20 ③
Complexo da desidrogenase de α-cetoácidos de cadeia ramificada		248.600	Cetonúria de cadeias ramificadas (MSUD)	29-20 ①
Metionina-adenosiltransferase	2.5.1.6	250.850	Hipermetioninemia	29-18 ①
Ornitina-δ-aminotransferase	2.6.1.13	258.870	Ornitemia, atrofia convoluta	29-4 ②
Fenilalanina-hidroxilase	1.14.16.1	261.600	Fenilcetonúria clássica, tipo I	27-10 ①
Prolina-desidrogenase	1.5.99.8	606.810	Hiperprolinemia tipo I	29-3 ①
Δ^1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase	1.5.1.12	606.811	Hiperprolinemia tipo II e hiper-4-hidroxiprolinemia	29-3 ②
Sacaropina-desidrogenase	1.5.1.7	268.700	Sacaropinúria	29-15 ②
Tirosina-aminotransferase	2.6.l.15	613.018	Tirosinemia tipo II	29-13 ①

[1]Banco de dados da *online Mendelian Inheritance in Man*: ncbi.nlm.nih.gov/omim/

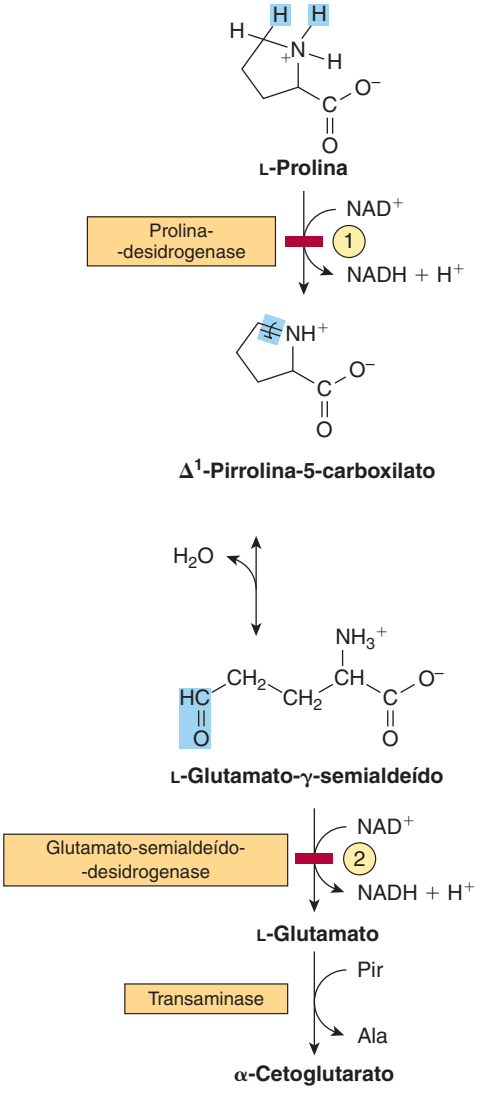


FIGURA 29-3 Catabolismo da prolina. As barras em vermelho e os números dentro dos círculos indicam o local dos defeitos metabólicos hereditários na ① hiperprolinemia tipo I e ② hiperprolinemia tipo II.

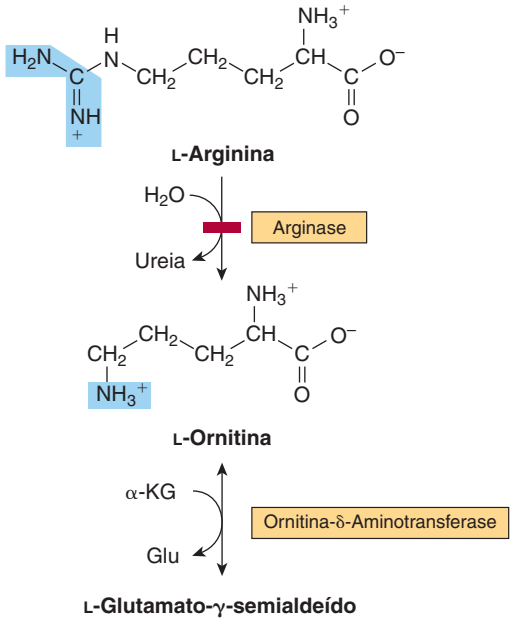


FIGURA 29-4 Catabolismo da arginina. A clivagem da L-arginina, catalisada pela arginase, forma ureia e L-ornitina. Esta reação (barra vermelha) representa o local do defeito metabólico hereditário na hiperarginemia. A transaminação subsequente da L-ornitina em glutamato-γ-semialdeído é seguida de conversão em α-cetoglutarato (ver Figura 29-3).

CATABOLISMO DA GLICINA, SERINA, ALANINA, CISTEÍNA, TREONINA E 4-HIDROXIPROLINA

Glicina

O **complexo de clivagem da glicina** das mitocôndrias hepáticas desdobra a glicina em CO_2 e NH_4^+ e forma N^5,N^{10}-metileno tetra-hidrofolato.

$$\text{Glicina} + \text{H}_4\text{folato} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + \text{NH}_3 + 5,10\text{-CH}_2\text{-H}_4\text{folato} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

O sistema de clivagem da glicina (**Figura 29-6**) consiste em três enzimas e em uma "H-proteína" que apresenta uma fração di-hidrolipoil ligada de modo covalente. A Figura 29-6 também ilustra as reações individuais e os intermediários na clivagem da glicina. Na **hiperglicinemia não cetótica**, um erro inato raro da degradação da glicina atualmente detectado apenas na Finlândia, a glicina acumula-se em todos os tecidos do corpo, inclusive no sistema nervoso central. O defeito na **hiperoxalúria primária** consiste na incapacidade de catabolizar o glioxilato formado pela desaminação da glicina. A oxidação subsequente do glioxilato a oxalato resulta em urolitíase, nefrocalcinose e mortalidade precoce por insuficiência renal ou hipertensão. A **glicinúria** resulta de um defeito na reabsorção tubular renal.

Serina

Após conversão em glicina, catalisada pela **serina hidroximetiltransferase**, o catabolismo da serina é o mesmo que o da glicina (**Figura 29-7**).

Alanina

A transaminação da α-alanina forma piruvato. Provavelmente em virtude de seu papel central no metabolismo, não existe nenhum defeito metabólico conhecido no catabolismo da α-alanina.

Cistina e cisteína

A cistina é inicialmente reduzida a cisteína pela **cistina-redutase** (**Figura 29-8**). Em seguida, duas vias diferentes convertem a cisteína em piruvato (**Figura 29-9**). Existem numerosas anormalidades no metabolismo da cisteína. Ocorre excreção de cistina, lisina, arginina e ornitina na **cistina-lisinúria** (**cistinúria**), um defeito na reabsorção renal desses aminoácidos. Com exceção dos cálculos de cistina, a cistinúria é benigna. O dissulfeto misto

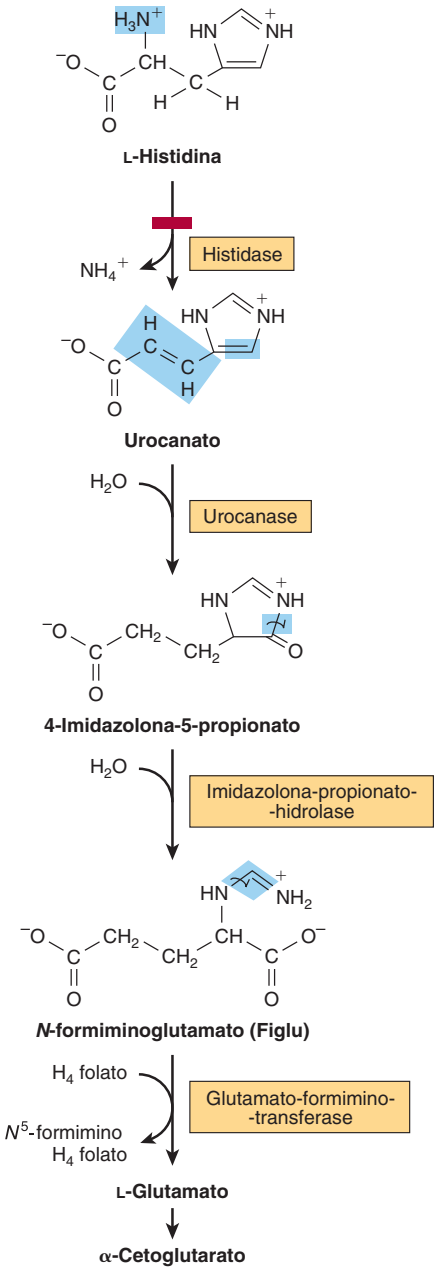


FIGURA 29-5 Catabolismo da L-histidina a α-cetoglutarato. (H_4folato, tetra-hidrofolato.) A barra vermelha indica o local de um defeito metabólico hereditário.

de L-cisteína e L-homocisteína (**Figura 29-10**) excretado por pacientes com cistinúria é mais solúvel do que a cistina e diminui a formação de cálculos de cistina.

Vários defeitos metabólicos resultam em **homocistinúria** responsiva ou não responsiva à vitamina B_6. Esses distúrbios incluem uma deficiência na reação catalisada pela cistationina β-sintase:

$$\text{Serina} + \text{homocisteína} \rightarrow \text{cistationina} + H_2O$$

As consequências incluem osteoporose e retardo mental. O transporte deficiente da cistina mediado por carreador resulta em **cistinose** (**doença de armazenamento da cistina**) com depósito de cristais de cistina nos tecidos e mortalidade precoce

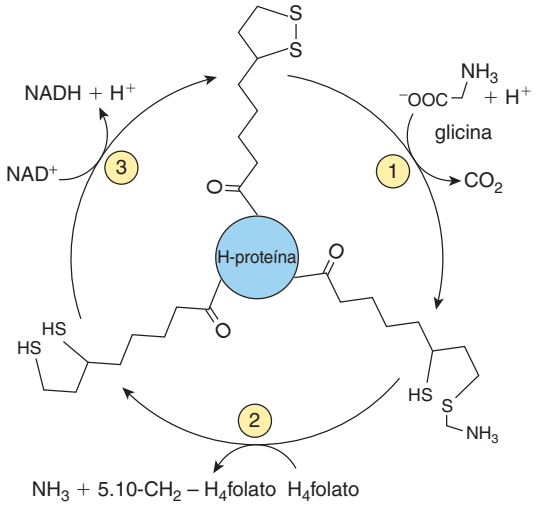


FIGURA 29-6 O sistema de clivagem da glicina das mitocôndrias hepáticas. O complexo de clivagem da glicina consiste em três enzimas e em uma "H-proteína" que apresenta di-hidrolipoato ligado de modo covalente. Os catalisadores das reações numeradas são: ① glicina desidrogenase (descarboxilante), ② aminometiltransferase formadora de amônia e ③ di-hidrolipoamida desidrogenase. (H_4 folato, tetra-hidrofolato).

por insuficiência renal aguda. Dados epidemiológicos e outras informações associam os níveis plasmáticos de homocisteína a um risco cardiovascular, mas o papel da homocisteína como risco cardiovascular causal permanece controverso.

Treonina

A treonina-aldolase converte a treonina em acetaldeído e glicina. O catabolismo da glicina já foi discutido anteriormente. A oxidação do acetaldeído a acetato é seguida de formação de acetil-CoA (**Figura 29-11**).

4-Hidroxiprolina

O catabolismo da 4-hidroxi-L-prolina forma, sucessivamente, L-Δ^1-pirrolina-3-hidroxi-5-carboxilato, γ-hidroxi-L-glutamato-γ-semialdeído, eritro-γ-hidroxi-L-glutamato e α-ceto-γ-hidroxiglutarato. Em seguida, uma clivagem tipo aldol forma glioxilato e piruvato (**Figura 29-12**). Um defeito na **4-hidroxiprolina-desidrogenase** resulta em **hiper-hidroxiprolinemia,** que é benigna. Não existe nenhum comprometimento associado do catabolismo

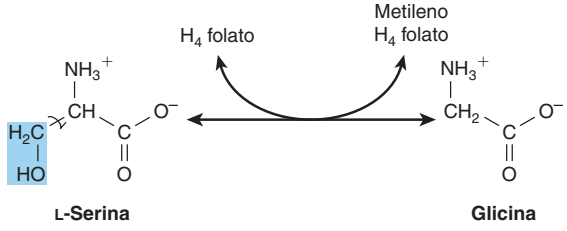


FIGURA 29-7 Interconversão da serina e da glicina pela serina hidroximetiltransferase. (H_4 folato, tetra-hidrofolato).

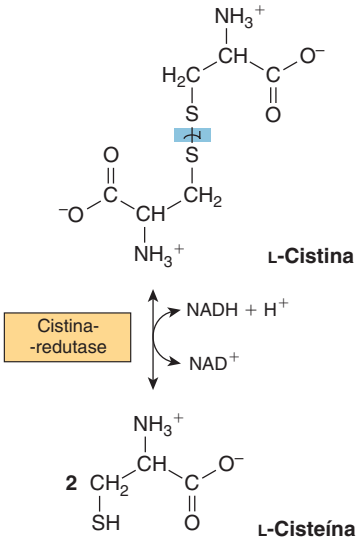


FIGURA 29-8 Redução da cistina a cisteína na reação da cistina redutase.

da prolina. Conforme assinalado anteriormente na prolina, a ocorrência de um defeito na **glutamato-γ-semialdeído desidrogenase** é acompanhada da excreção de Δ^1-pirrolina-3-hidroxi-5--carboxilato.

OUTROS AMINOÁCIDOS QUE FORMAM ACETIL-COA

Tirosina

A **Figura 29-13** ilustra os intermediários e as enzimas que participam no catabolismo da tirosina a intermediários anfibólicos. Após transaminação da tirosina em *p*-hidroxifenilpiruvato, reações sucessivas formam maleilacetoacetato, fumarilacetoacetato, fumarato, acetoacetato e, por fim, acetil-CoA e acetato.

Vários distúrbios metabólicos estão associados à via do catabolismo da tirosina. O provável defeito metabólico na **tirosinemia tipo I** (**tirosinose**) envolve a **fumarilacetoacetato-hidrolase** (reação 4, Figura 29-1). O tratamento consiste em dieta com baixo teor de tirosina e fenilalanina. Sem tratamento, a tirosinose aguda e crônica leva à morte por insuficiência hepática. Metabólitos alternativos da tirosina também são excretados na **tirosinemia tipo II** (**síndrome de Richner-Hanhart**), um defeito na **tirosina-aminotransferase** (reação 1, Figura 29-13), bem como na **tirosinemia neonatal,** causada pela atividade reduzida da *p*--hidroxifenilpiruvato-hidroxilase (reação 2, Figura 29-13). O tratamento consiste em dieta com baixo teor de proteínas.

O defeito metabólico na **alcaptonúria** consiste em deficiência da **homogentisato-oxidase**, a enzima que catalisa a reação 3 da Figura 29-13. A urina escurece quando exposta ao ar, devido à oxidação do homogentisato excretado. Nos estágios avançados da doença, ocorrem artrite e pigmentação do tecido conectivo (ocronose), em consequência da oxidação do homogentisato a benzoquinona acetato, que sofre polimerização e liga-se ao tecido conectivo. Descrita pela primeira vez no século XVI, com

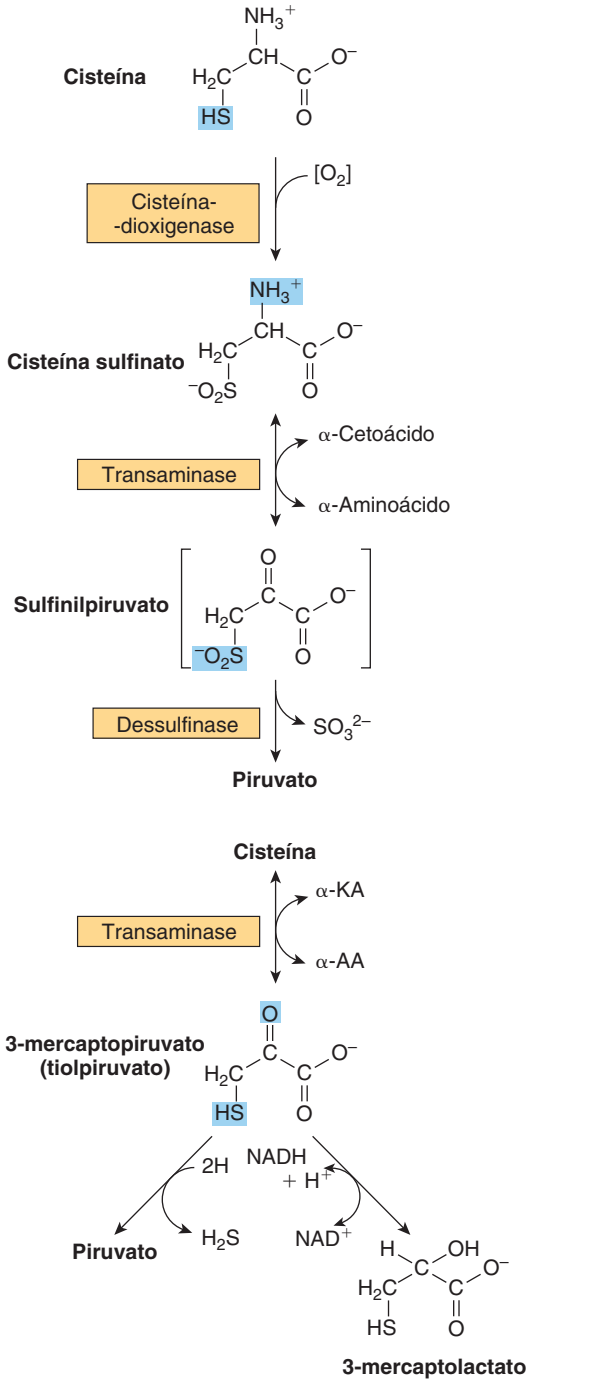


FIGURA 29-9 Duas vias catabolizam a L-cisteína: a via da cisteína sulfinato (*parte superior*) e a via do 3-mercaptopurivato (*parte inferior*).

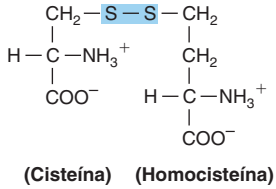


FIGURA 29-10 Estrutura do dissulfeto misto de cisteína e homocisteína.

base na observação de que a urina escurecia quando exposta ao ar, a alcaptonúria forneceu a base para as ideias clássicas de Sir Archibald Garrod no início do século XX sobre os distúrbios metabólicos hereditários. Com base na presença de ocronose e evidências químicas, o primeiro caso conhecido de alcaptonúria foi, entretanto, descrito em 1977 com a sua detecção em uma múmia egípcia datando de 1500 a.C.

Fenilalanina

A fenilalanina é inicialmente convertida em tirosina (ver Figura 27-10). As reações subsequentes são as mesmas envolvidas na tirosina (Figura 29-13). As **hiperfenilalaninemias** surgem em decorrência de defeitos na fenilalanina hidroxilase (**fenilcetonúria** [**PKU**] **clássica tipo I**, com frequência de 1 em 10.000 nascimentos), na di-hidrobiopterina-redutase (**tipos II e III**) ou na biossíntese de di-hidrobiopterina (**tipos IV e V**) (ver Figura 27-10). Os catabólitos alternativos são excretados (**Figura 29-14**). Uma dieta com baixo teor de fenilalanina pode evitar a ocorrência de retardo mental da PKU.

As sondas de DNA facilitam o diagnóstico pré-natal de defeitos na fenilalanina-hidroxilase ou di-hidrobiopterina redutase. Os níveis sanguíneos elevados de fenilalanina podem não

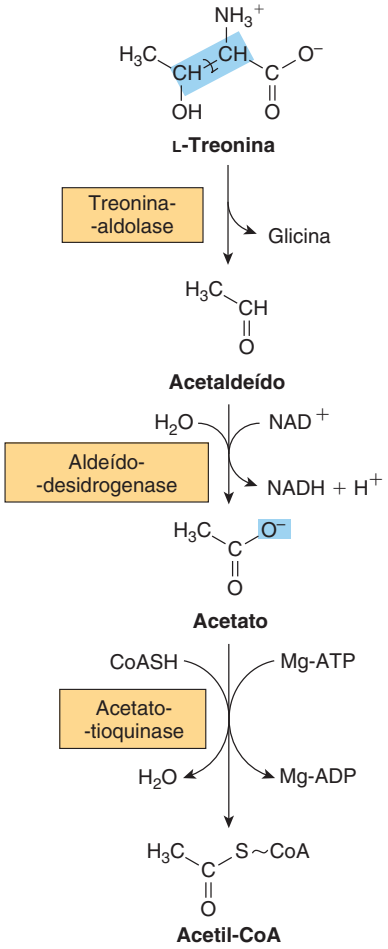


FIGURA 29-11 Intermediários na conversão da treonina em glicina e acetil-CoA.

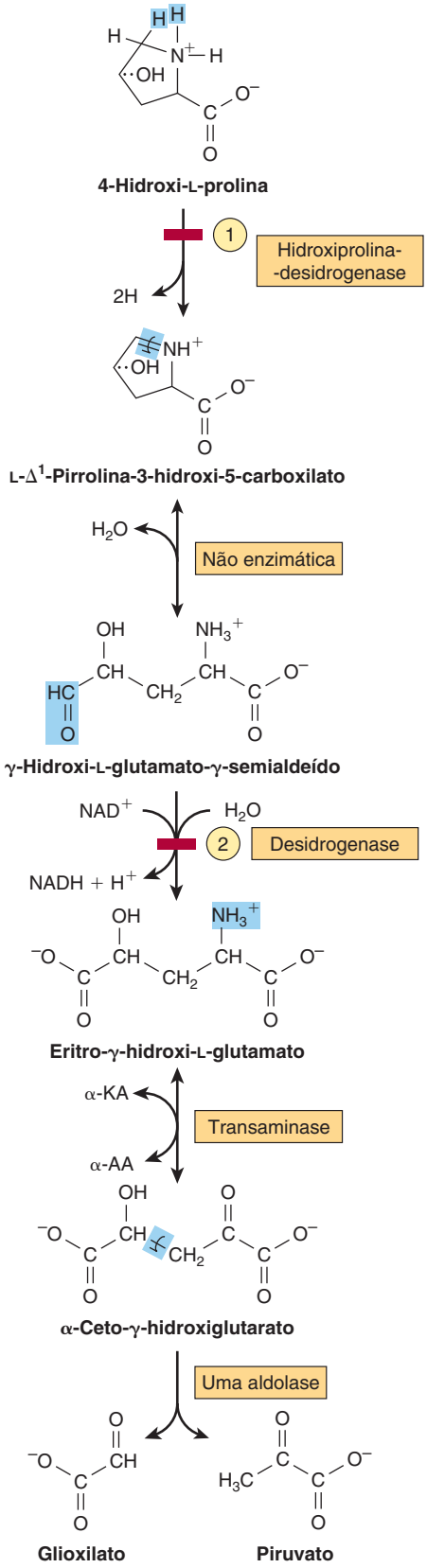


FIGURA 29-12 Intermediários no catabolismo da L-hidroxiprolina. (α-AA, α-aminoácido; α-KA, α-cetoácido.) As barras vermelhas indicam os sítios dos defeitos metabólicos hereditários na ① hiper-hidroxiprolinemia e ② hiperprolinemia tipo 2.

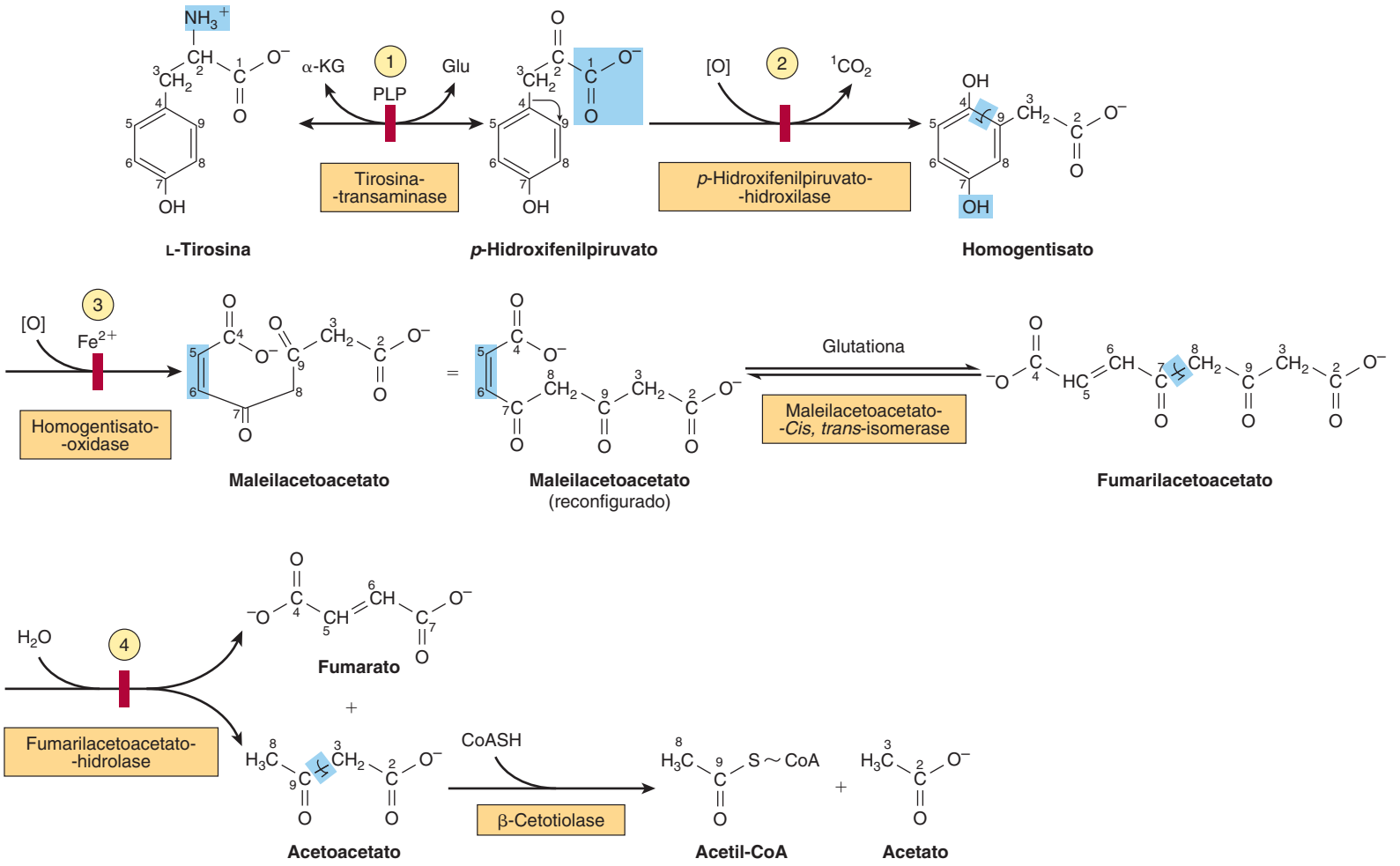


FIGURA 29-13 Intermediários no catabolismo da tirosina. Os carbonos são numerados para ressaltar o seu destino final. (α-KG, α-cetoglutarato; Glu, glutamato; PLP, piridoxal-fosfato.) As barras vermelhas indicam os prováveis locais dos defeitos metabólicos hereditários na ① tirosinemia tipo II; ② tirosinemia neonatal; ③ alcaptonúria; e ④ tirosinemia tipo I ou tirosinose.

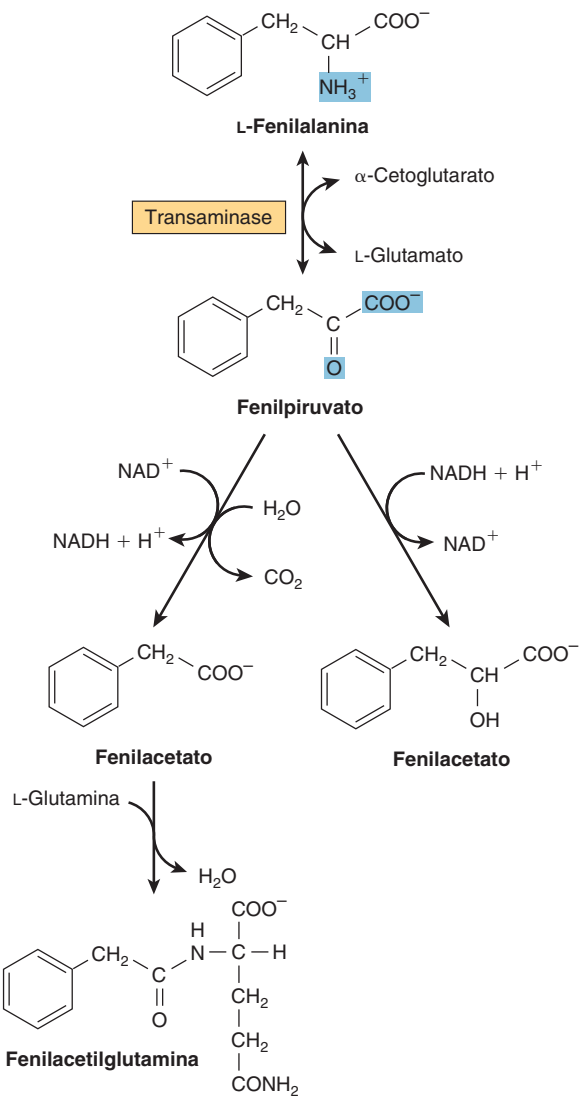


FIGURA 29-14 Vias alternativas do catabolismo da fenilalanina na fenilcetonúria. Estas reações também ocorrem no tecido hepático normal, porém têm pouco significado.

ser detectáveis até três a quatro dias depois do nascimento. Nos lactentes prematuros, os resultados falso-positivos podem refletir uma maturação tardia das enzimas envolvidas no catabolismo da fenilalanina. Um teste de triagem mais antigo e menos confiável emprega o $FeCl_3$ para detectar o fenilpiruvato na urina. A triagem com $FeCl_3$ para PKU na urina de recém-nascidos é obrigatória em muitos países, porém nos EUA foi suplantada, em grande parte, pela espectrometria de massa em *tandem* (sequencial).

Lisina

As primeiras seis reações do catabolismo da L-lisina no fígado humano formam a crotonil-CoA, que então é degradada em acetil-CoA pelas reações do catabolismo de ácidos graxos (ver Figura 22-3). A seguir, os números circulados referem-se às reações correspondentes numeradas na **Figura 29-15**. As reações 1 e 2 convertem a base de Schiff formada entre o α-cetoglutarato e

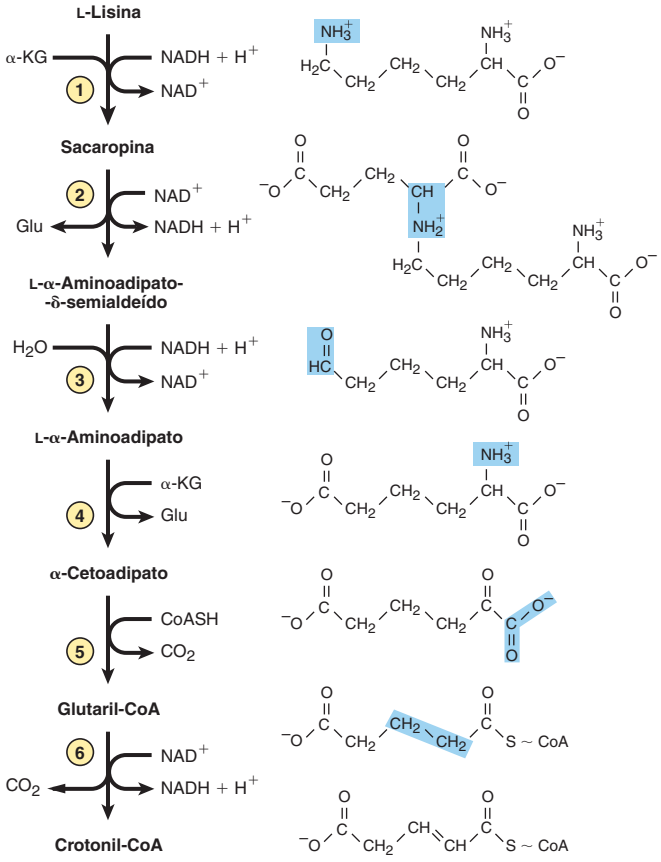


FIGURA 29-15 Reações e intermediários no catabolismo da L-lisina.

o grupo ε-amino da lisina em L-α-aminoadipato-δ-semialdeído. As reações 1 e 2 são ambas catalisadas por uma única enzima bifuncional, a aminoadipato semialdeído-sintase (também denominada lisina 2-oxoglutarato-redutase-sacaropina-desidrogenase). A redução do L-α-aminoadipato-δ-semialdeído a L-α-aminoadipato (reação 3) é seguida de transaminação a α-cetoadipato (reação 4). A conversão em tioéster-glutaril-CoA (reação 5) é seguida da descarboxilação da glutaril-CoA em crotonil-CoA (reação 6). As reações subsequentes são as mesmas envolvidas no catabolismo de ácidos graxos.

Entre os defeitos metabólicos associados às reações da via do catabolismo da lisina, destacam-se as hiperlisinemias. A hiperlisinemia pode resultar de um defeito na atividade 1 ou 2 da enzima bifuncional, a aminoadipato semialdeído sintase. A hiperlisinemia é acompanhada de níveis sanguíneos elevados de sacaropina apenas quando o defeito afeta a atividade 2. Um defeito metabólico na reação 6 resulta em uma doença metabólica hereditária associada à degeneração estriatal e cortical; caracteriza-se por concentrações elevadas de glutarato e seus metabólitos, glutaconato e 3-hidroxiglutarato. O desafio no tratamento desses defeitos metabólicos consiste em restringir a ingestão alimentar de L-lisina sem causar desnutrição.

Triptofano

O triptofano é degradado em intermediários anfibólicos pela via da quinurenina-antranilato (**Figura 29-16**). A **triptofano**

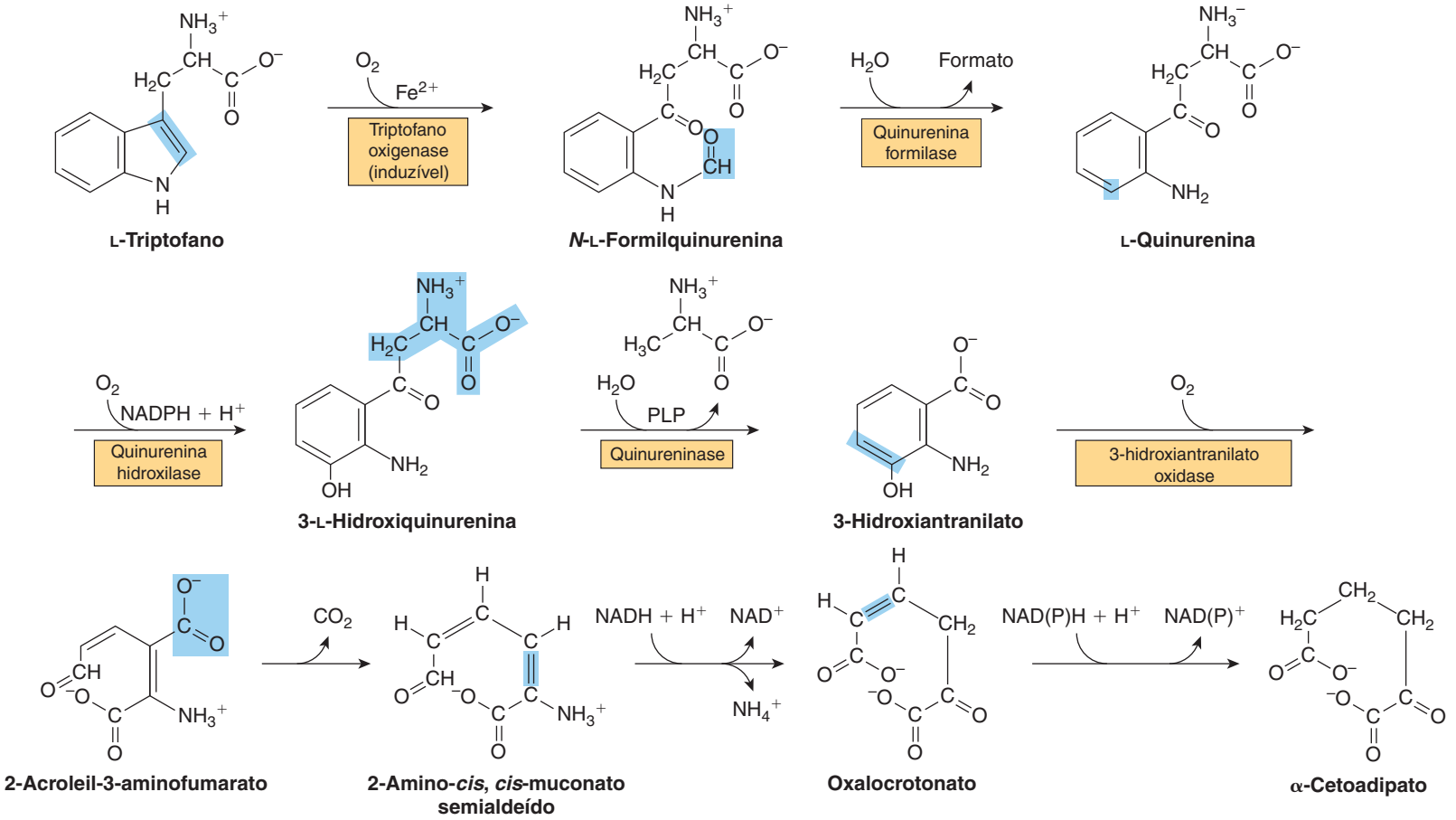


FIGURA 29-16 Reações e intermediários no catabolismo do L-triptofano. (PLP, piridoxal fosfato).

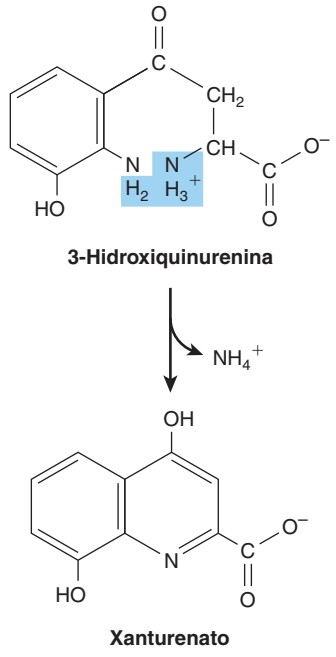


FIGURA 29-17 Formação do xanturenato na deficiência de vitamina B_6. A conversão do metabólito do triptofano, a 3-hidroxiquinurenina, em 3-hidroxiantranilato está comprometida (ver Figura 29-16). Portanto, uma grande parte é convertida em xanturenato.

oxigenase (**triptofano-pirrolase**) abre o anel indol, incorpora o oxigênio molecular e forma *N*-formilquinurenina. A triptofano-oxigenase, uma metaloproteína de ferro-porfirina induzível no fígado pelos corticosteroides suprarrenais e pelo triptofano, é inibida por retroalimentação pelos derivados do ácido-nicotínico, incluindo NADPH. A remoção hidrolítica do grupo formil da *N*-formilquinurenina, catalisada pela **quinurenina-formilase,** produz quinurenina. Uma vez que a **quinureninase** requer piridoxal-fosfato, a excreção de xanturenato (**Figura 29-17**) em resposta a uma carga de triptofano confirma o diagnóstico de deficiência de vitamina B_6. A **doença de Hartnup** reflete o comprometimento do transporte intestinal e renal do triptofano e de outros aminoácidos neutros. São excretados derivados indólicos do triptofano não absorvido, formados pelas bactérias intestinais. O defeito limita a disponibilidade de triptofano para a biossíntese de niacina e é responsável pelos sinais e sintomas semelhantes aos da pelagra.

Metionina

A metionina reage com ATP, formando *S*-adenosilmetionina, a "metionina ativa" (**Figura 29-18**). As reações subsequentes formam propionil-CoA (**Figura 29-19**), que é convertido em succinil-CoA por três reações subsequentes (ver Figura 20-2).

AS REAÇÕES INICIAIS SÃO COMUNS A TODOS OS TRÊS AMINOÁCIDOS DE CADEIAS RAMIFICADAS

As primeiras três reações do catabolismo da isoleucina, leucina e valina (**Figura 29-20**) são análogas às reações do catabolismo dos ácidos graxos (ver Figura 22-3). Após transaminação (Figura 29-20, reação 1), os esqueletos de carbono dos α-cetoácidos resultantes sofrem descarboxilação oxidativa e conversão em tioésteres de coenzima A. Esse processo em múltiplas etapas é catalisado pelo **complexo da desidrogenase de α-cetoácidos de cadeia ramificada**, cujos componentes são funcionalmente idênticos aos do complexo de piruvato desidrogenase (PDH) (ver Figura 18-5). À semelhança da PDH, o complexo da desidrogenase de α-cetoácidos de cadeia ramificada consiste em cinco componentes.

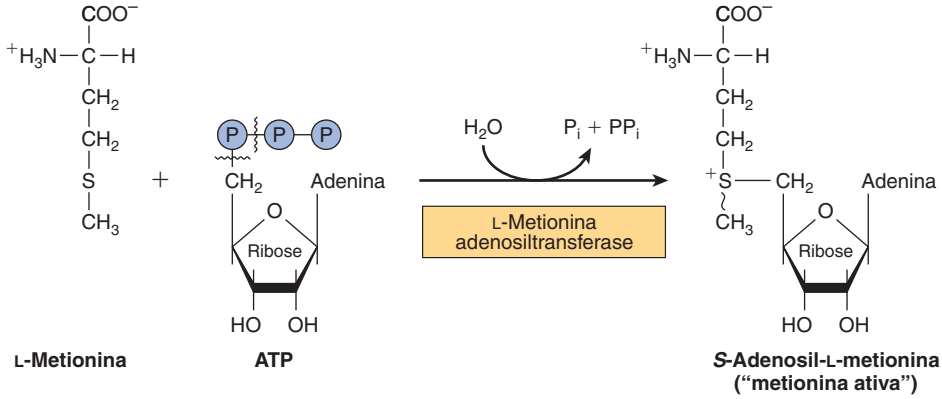


FIGURA 29-18 Formação da *S*-adenosilmetionina. ~CH_3 representa o alto potencial de transferência de grupo da "metionina ativa".

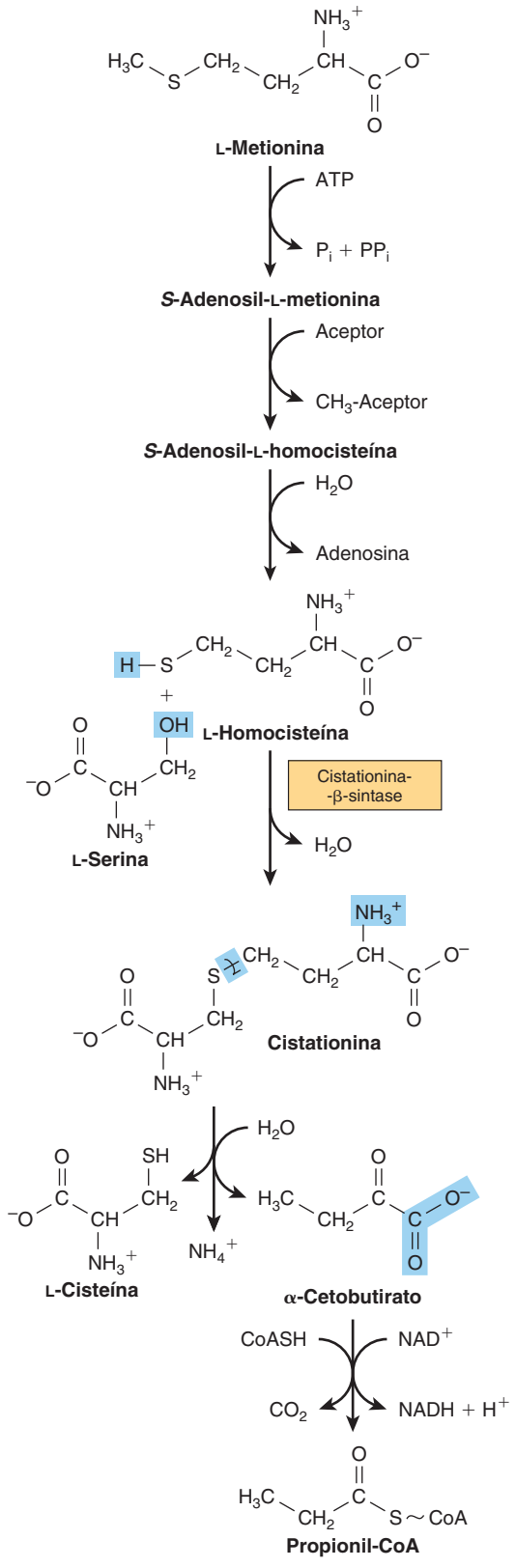


FIGURA 29-19 Conversão da metionina em propionil-CoA.

E1: descarboxilase de α-cetoácidos de cadeia ramificada dependente de tiamina pirofosfato (TPP).
E2: di-hidrolipoil-transacetilase (contém lipoamida).
E3: di-hidrolipoamida-desidrogenase (contém FAD).
Proteinoquinase.
Proteína fosfatase.

À semelhança da PDH (ver Figura 18-6(B)), a proteína quinase e a proteína fosfatase regulam a atividade do complexo da desidrogenase de α-cetoácidos de cadeia ramificada por meio de fosforilação (inativação) e desfosforilação (ativação).

A desidrogenação dos tioésteres de coenzima A resultantes (reação 3, Figura 29-20) prossegue como a desidrogenação dos tioésteres de acil-CoA graxo derivados de lipídeos (ver Figura 22-3). As reações subsequentes, exclusivas para o esqueleto de cada aminoácido, são apresentadas nas **Figuras 29-21, 29-22** e **29-23.**

DISTÚRBIOS METABÓLICOS DO CATABOLISMO DOS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA

Como o próprio nome indica, o odor da urina na **doença da urina em xarope de bordo** (**cetonúria de cadeia ramificada ou MSUD**) sugere o odor do xarope de bordo ou de açúcar queimado. O defeito bioquímico na MSUD envolve o **complexo da desidrogenase de α-cetoácidos** (reação 2, Figura 29-20). Os níveis plasmáticos e urinários de leucina, isoleucina, valina e seus α-cetoácidos e α-hidroxiácidos (α-cetoácidos reduzidos) estão elevados, porém os cetoácidos urinários provêm principalmente da leucina. Os sinais e sintomas da MSUD frequentemente consistem em cetoacidose fatal, distúrbios neurológicos, retardo mental e odor da urina semelhante ao do xarope de bordo. O mecanismo da toxicidade não é conhecido. O diagnóstico precoce estabelecido por análise enzimática é essencial para evitar a lesão cerebral e a mortalidade precoce, mediante substituição da proteína alimentar por uma mistura de aminoácidos sem leucina, isoleucina e valina.

A genética molecular da MSUD é heterogênea. A MSUD pode resultar de mutações nos genes que codificam a E1, E1β E2 e E3. Com base no *locus* afetado, são reconhecidos subtipos genéticos de MSUD. A MSUD tipo IA decorre de mutações no gene E1α, o tipo IB, no gene E1β, o tipo II, no gene E2, e o tipo III, no gene E3 (**Tabela 29-3**). Na **cetonúria intermitente de cadeias ramificadas**, a α-cetoácido-descarboxilase conserva alguma atividade, e os sintomas surgem mais tardiamente durante a vida. Na **acidemia isovalérica**, a ingestão de alimentos ricos em proteína aumenta os níveis de isovalerato, o produto de desacilação da isovaleril-CoA. A enzima acometida na **acidemia isovalérica** é a **isovaleril-CoA-desidrogenase** (reação 3, Figura 29-20). A ingestão de proteína em excesso é seguida de vômitos, acidose e coma. A isovaleril-CoA acumulada é hidrolisada a isovalerato e excretada.

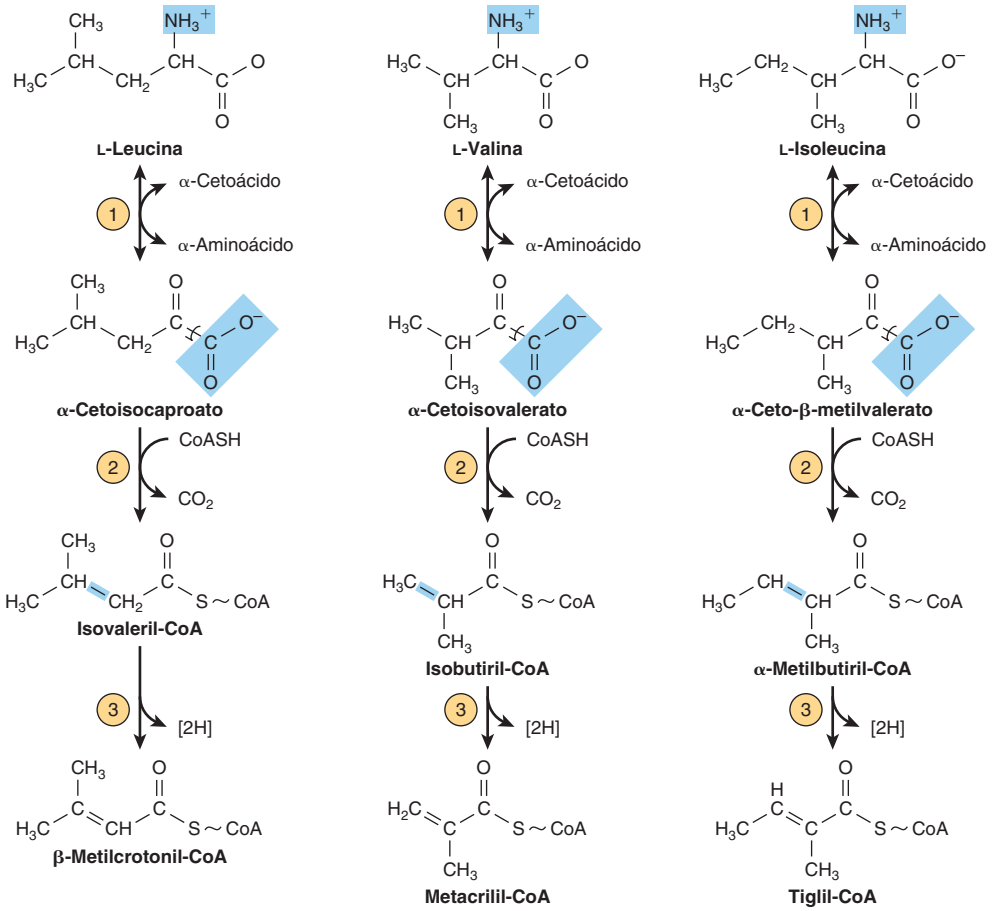


FIGURA 29-20 As primeiras três reações no catabolismo da leucina, valina e isoleucina. Observe a analogia das reações 2 e 3 com as reações do catabolismo dos ácidos graxos (ver Figura 22-3). A analogia com o catabolismo dos ácidos graxos continua, como mostram as figuras seguintes.

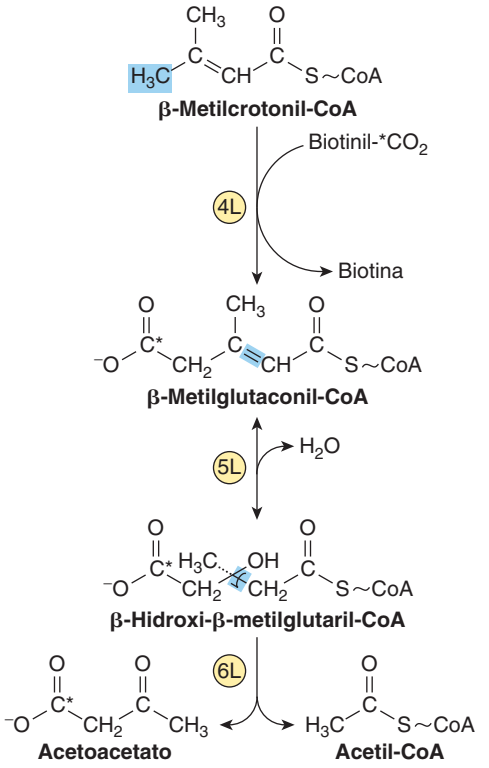


FIGURA 29-21 Catabolismo da β-metilcrotonil-CoA formada a partir da L-leucina. Os asteriscos indicam átomos de carbono derivados do CO_2.

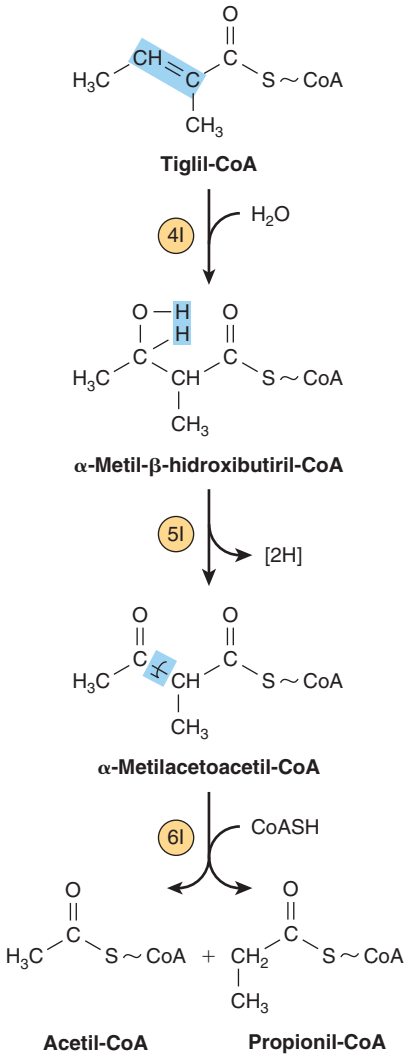


FIGURA 29-22 Catabolismo subsequente da tiglil-CoA formada a partir da L-isoleucina.

TABELA 29-3 A doença da urina em xarope de bordo pode refletir o comprometimento da função de vários componentes do complexo da α-cetoácido-descarboxilase

Componente da desidrogenase de α-cetoácidos de cadeia ramificada		Referência OMIM[1]	Doença da urina em xarope de bordo
E1α	α-Cetoácido-descarboxilase	608.348	Tipo 1A
E1β	α-Cetoácido-descarboxilase	248.611	Tipo 1B
E2	Di-hidrolipoil-transacilase	608.770	Tipo II
E3	Di-hidrolipoamida--desidrogenase	238.331	Tipo III

[1] Banco de dados da *Online Mendelian Inheritance in Man*: ncbi.nim.nih.gov/omim/

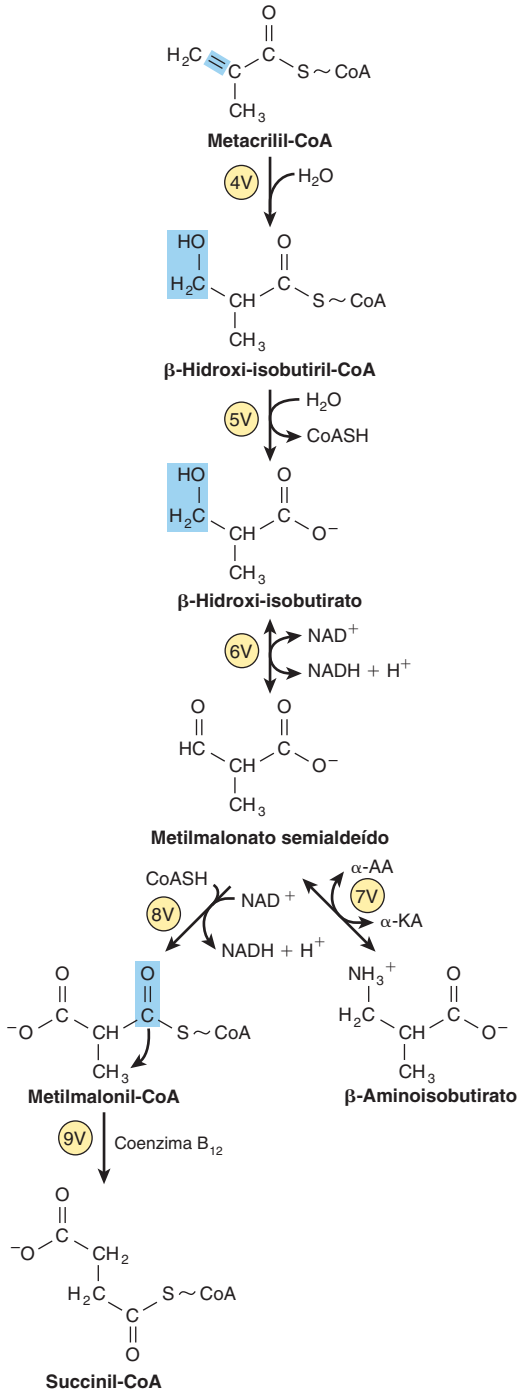


FIGURA 29-23 Catabolismo subsequente da metacrilil-CoA formada a partir da L-valina (ver Figura 29-20). (α-AA, α-aminoácido; α-KA, α-cetoácido.)

RESUMO

- O excesso de aminoácidos é catabolizado a intermediários anfibólicos, que atuam como fontes de energia ou para a biossíntese de carboidratos e lipídeos.
- A transaminação é a reação inicial mais comum no catabolismo dos aminoácidos. As reações subsequentes removem qualquer nitrogênio adicional e reestruturam os esqueletos hidrocarbonados para conversão em oxalacetato, α-cetoglutarato, piruvato e acetil-CoA.
- As doenças metabólicas associadas ao catabolismo da glicina são a glicinúria e a hiperoxalúria primária.
- Duas vias distintas convertem a cisteína em piruvato. Os distúrbios metabólicos do catabolismo da cisteína incluem cistina-lisinúria, doença de armazenamento da cistina e as homocistinúrias.
- O catabolismo da treonina mistura-se com o da glicina após a clivagem da treonina pela treonina-aldolase, formando glicina e acetaldeído.
- Após transaminação, o esqueleto carbonado da tirosina é degradado a fumarato e acetoacetato. As doenças metabólicas do catabolismo da tirosina incluem a tirosinose, a síndrome de Richner-Hanhart, a tirosinemia neonatal e a alcaptonúria.
- Os distúrbios metabólicos do catabolismo da fenilalanina são a PKU e várias hiperfenilalaninemias.
- Nenhum nitrogênio da lisina sofre transaminação direta. Entretanto, o mesmo efeito é obtido pela formação intermediária de sacaropina. As doenças metabólicas do catabolismo da lisina incluem formas periódica e persistente de hiperlisinemia-amonemia.
- O catabolismo da leucina, da valina e da isoleucina apresenta muitas analogias com o catabolismo dos ácidos graxos. Os distúrbios metabólicos do catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada incluem a hipervalinemia, a doença da urina em xarope de bordo, a cetonúria intermitente de cadeia ramificada, a acidemia-isovalérica e a acidúria-metilmalônica.

REFERÊNCIAS

Blacher J, Safar ME: Homocysteine, folic acid, B vitamins and cardiovascular risk. J Nutr Health Aging 2001;5:196.

Bliksrud YT, Brodtkorb E, Andresen PA, et al: Tyrosinemia type I, de novo mutation in liver tissue suppressing an inborn splicing defect. J Mol Med 2005;83:406.

Dobrowolski, Pey AL, Koch R, et al: Biochemical characterization of mutant phenylalanine hydroxylase enzymes and correlation with clinical presentation in hyperphenylalaninaemic patients. J Inherit Metab Dis 2009:32;10.

Flusser H, Korman SH, Sato K, et al: Mild glycine encephalopathy (NKH) in a large kindred due to a silent exonic GLDC splice mutation. Neurology 2005;64:1426.

Garg U, Dasouki M: Expanded newborn screening of inherited metabolic disorders by tandem mass spectrometry. Clinical and laboratory aspects. Clin Biochem 2006;39:315.

Gerstner B, Gratopp A, Marcinkowski M, et al: Glutaric acid and its metabolites cause apoptosis in immature oligodendrocytes: a novel mechanism of white matter degeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. Pediatr Res 2005;57;771.

Häussinger D, Schliess F: Glutamine metabolism and signaling in the liver. Front Biosci 2007;12:371.

Heldt K, Schwahn B, Marquardt I, et al: Diagnosis of maple syrup urine disease by newborn screening allows early intervention without extraneous detoxification. Mol Genet Metab 2005;84:313.

Moshal K, Camel CK, Kartha GK, et al: Cardiac dys-synchronization and arrhythmia in hyperhomocysteinemia. Curr Neurovasc Res 2007;4:289.

Muller E, Kolker S: Reduction of lysine intake while avoiding malnutrition: major goals and major problems in dietary treatment of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. J Inherit Metab Dis 2004;27:903.

Sacksteder KA, Biery BJ, Morrell JC, et al: Identification of the alpha-aminoadipic semialdehyde synthase gene which is defective in familial hyperlysinemia. Am J Hum Genet 2000;66:1736.

Scriver CR, Sly WS, Childs B, et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 8th ed. McGraw-Hill, 2001.

Stenn FF, Milgram JW, Lee SL, et al: Biochemical identification of homogentisic acid pigment in an ochronotic Egyptian mummy. Science 1977;197:566.

Waters PJ, Scriver CR, Parniak MA: Homomeric and heteromeric interactions between wild-type and mutant phenylalanine hydroxylase subunits: evaluation of two-hybrid approaches for functional analysis of mutations causing hyperphenylalaninemia. Mol Genet Metab 2001;73:230.

CAPÍTULO 30

Conversão dos Aminoácidos em Produtos Especializados

Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever como os aminoácidos participam de uma variedade de processos de biossíntese, além da síntese das proteínas.
- Delinear como a arginina participa na biossíntese da creatina, do óxido nítrico (NO), da putrescina, da espermina e da espermidina.
- Indicar a contribuição da cisteína e da β-alanina na estrutura da coenzima A e da cisteína na estrutura do ácido taurocólico.
- Discutir o papel da glicina no catabolismo de fármacos.
- Descrever, de modo sucinto, o papel da glicina na biossíntese do heme, das purinas, da creatina e da sarcosina.
- Identificar a reação que converte um aminoácido em um neurotransmissor histamina.
- Descrever o papel da *S*-adenosilmetionina como fonte de grupos metila no metabolismo.
- Reconhecer os metabólitos do triptofano, serotonina e melatonina, e a conversão do triptofano em triptamina e, subsequentemente, em indol 3-acetato.
- Indicar o papel da tirosina na formação da norepinefrina, epinefrina, tri-iodotironina e tiroxina.
- Ilustrar os papéis essenciais da peptidil-serina, treonina e tirosina na regulação metabólica e nas vias de transdução de sinais.
- Delinear os papéis da glicina, da arginina e da *S*-adenosilmetionina na biossíntese da creatina.
- Descrever o papel da creatina-fosfato na homeostasia energética.
- Descrever a formação do γ-aminobutirato (GABA) e os distúrbios metabólicos raros associados a defeitos no catabolismo do GABA.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Certas proteínas contêm aminoácidos que foram modificados após o processo de tradução para permitir o seu desempenho em funções específicas. Entre os exemplos, destacam-se a carboxilação do glutamato para formar γ-carboxiglutamato, que atua na ligação do Ca^{2+}, a hidroxilação da prolina para incorporação na tripla-hélice do colágeno, e a hidroxilação da lisina em hidroxilisina, cuja modificação subsequente e ligação cruzada estabilizam as fibras de colágeno em processo de maturação. Além de servirem como unidades básicas na síntese de proteínas, os aminoácidos atuam como precursores de materiais biológicos, como o heme, as purinas, as pirimidinas, os hormônios, os neurotransmissores e peptídeos biologicamente ativos. A histamina desempenha um papel central em muitas reações alérgicas. Os neurotransmissores derivados de aminoácidos incluem o γ-aminobutirato, a 5-hidroxitriptamina (serotonina), a dopamina, a norepinefrina e a epinefrina. Muitos fármacos usados no tratamento de distúrbios neurológicos e transtornos psiquiátricos atuam ao alterar o metabolismo desses neurotransmissores. A seguir, são discutidos o metabolismo e as funções metabólicas de α-aminoácidos e aminoácidos não α.

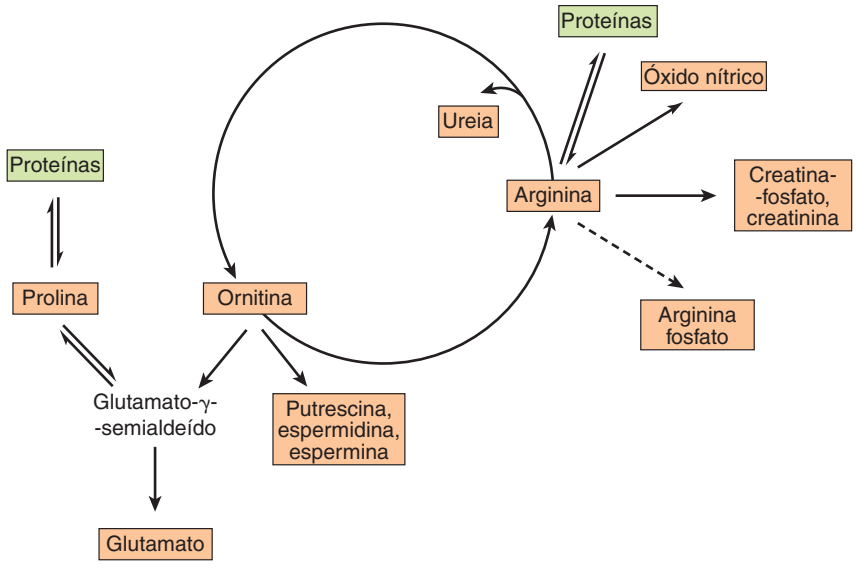


FIGURA 30-1 Metabolismo da arginina, ornitina e prolina. Todas as reações com setas de traço contínuo ocorrem nos tecidos dos mamíferos. A síntese de putrescina e de espermina ocorre tanto em mamíferos quanto em bactérias. A arginina fosfato do músculo dos invertebrados funciona como análogo fosfagênico da creatina fosfato do músculo dos mamíferos.

L-α-AMINOÁCIDOS

Alanina

A alanina atua como carreador de amônia e dos carbonos do piruvato do músculo esquelético para o fígado pelo ciclo de Cori (ver Figura 20-4) e, juntamente com a glicina, constitui uma importante fração dos aminoácidos livres no plasma.

Arginina

A **Figura 30-1** fornece um resumo dos destinos metabólicos da arginina. Além de atuar como carreador de átomos de nitrogênio na biossíntese da ureia (ver Figura 28-13), o grupo guanidino da arginina é incorporado na creatina, e, após conversão em ornitina, o seu esqueleto de carbono passa a constituir o esqueleto das poliaminas putrescina e espermina.

A reação catalisada pela NO sintase (**Figura 30-2**), uma oxidorredutase de cinco elétrons com múltiplos cofatores, converte um nitrogênio do grupo guanidino da arginina em L-ornitina e NO, uma molécula de sinalização intercelular que atua como neurotransmissor, relaxante do músculo liso e vasodilatador (ver Capítulo 49).

Cisteína

A cisteína participa na biossíntese da coenzima A (ver Figura 44-18) pela sua reação com o pantotenato, formando 4-fosfopantotenoil-cisteína (**Figura 30-3**). Três reações catalisadas por enzimas convertem a cisteína em taurina, a qual pode deslocar a fração coenzima A da colil-CoA, com formação do ácido biliar, o ácido taurocólico (ver Figura 26-7). A conversão da cisteína em taurina é iniciada pela sua oxidação em sulfinato de cisteína, catalisada pela enzima contendo Fe^{2+} não hêmico, a cisteína-dioxigenase. A descarboxilação do sulfinato de cisteína pela cisteína-sulfinato-descarboxilase forma hipotaurina, cuja oxidação pela hipotaurina-desidrogenase forma a taurina (**Figura 30-4**).

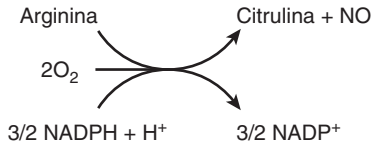


FIGURA 30-2 A reação catalisada pela óxido-nítrico-sintase.

Glicina

Os metabólitos e compostos farmacêuticos excretados como conjugados de glicina hidrossolúveis incluem o ácido glicólico

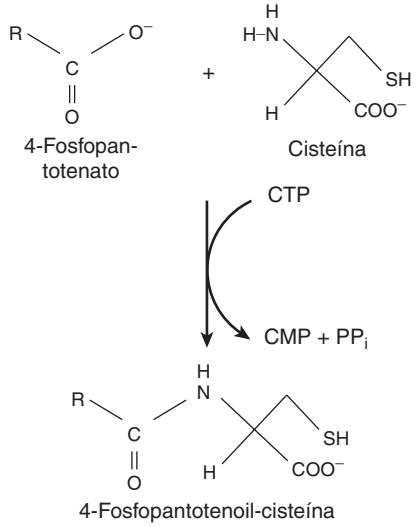


FIGURA 30-3 A reação catalisada pela fosfopantotenato cisteína ligase.

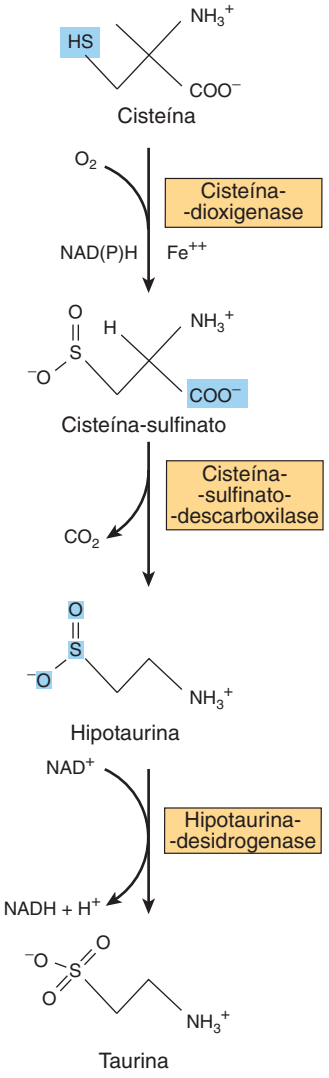


FIGURA 30-4 Conversão da cisteína em taurina. As reações são catalisadas pela cisteína dioxigenase, cisteína sulfinato descarboxilase e hipotaurina descarboxilase, respectivamente.

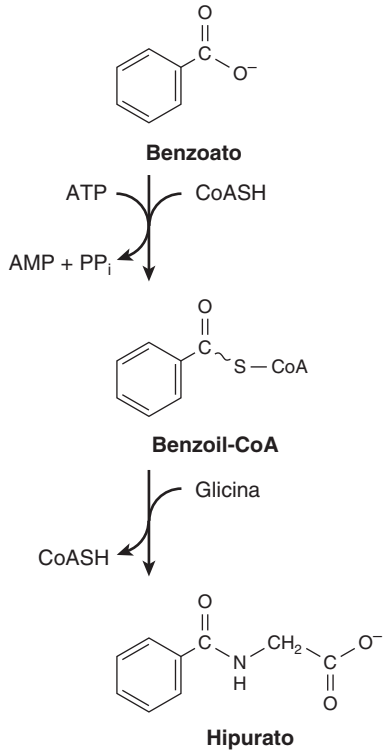


FIGURA 30-5 Biossíntese do hipurato. Ocorrem reações análogas com muitos fármacos e catabólitos ácidos.

(ver Capítulo 26) e o ácido hipúrico, formado a partir do aditivo alimentar benzoato (**Figura 30-5**). Muitos fármacos, metabólitos de fármacos e outros compostos com grupos carboxila são excretados na urina na forma de conjugados de glicina. A glicina é incorporada à creatina, e o nitrogênio e α-carbono da glicina são incorporados nos anéis pirrólicos e nos carbonos da ponte metileno do heme (ver Capítulo 31), e toda a molécula de glicina passa a constituir os átomos 4, 5 e 7 das purinas (ver Figura 33-1).

Histidina

A descarboxilação da histidina pela enzima dependente de piridoxal-5′-fosfato, a histidina-descarboxilase, forma histamina (**Figura 30-6**). A histamina, uma amina biogênica que atua em reações alérgicas e na secreção gástrica, é encontrada em todos os tecidos. A sua concentração no hipotálamo varia de acordo com um ritmo circadiano. Os compostos de histidina presentes no corpo humano incluem a ergotioneína, a carnosina e a anserina dietética (**Figura 30-7**). Embora suas funções fisiológicas não sejam conhecidas, a carnosina (β-alanil-histidina) e a homocarnosina (γ-aminobutiril-histidina) constituem os principais constituintes dos tecidos excitáveis, do cérebro e do músculo esquelético. Os níveis urinários de 3-metil-histidina estão acentuadamente baixos em pacientes com **doença de Wilson.**

Metionina

O principal destino não proteico da metionina consiste em sua conversão em *S*-adenosilmetionina, a principal fonte de grupos metila no corpo. A *S*-adenosilmetionina é sintetizada a partir da metionina e do ATP, em uma reação catalisada pela metionina adenosiltransferase (MAT) (**Figura 30-8**). Os tecidos humanos contêm três isoenzimas MAT (MAT-1 e MAT-3 do fígado e MAT-2 dos tecidos não hepáticos). Embora uma acentuada redução da atividade hepática da MAT-1 e MAT-3 possa resultar em **hipermetioninemia**, se houver uma atividade residual da MAT-1 ou MAT-3 e a atividade da MAT-2 estiver normal, uma

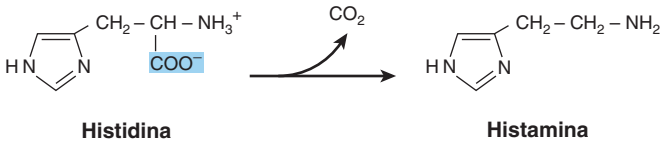


FIGURA 30-6 A reação catalisada pela histidina-descarboxilase.

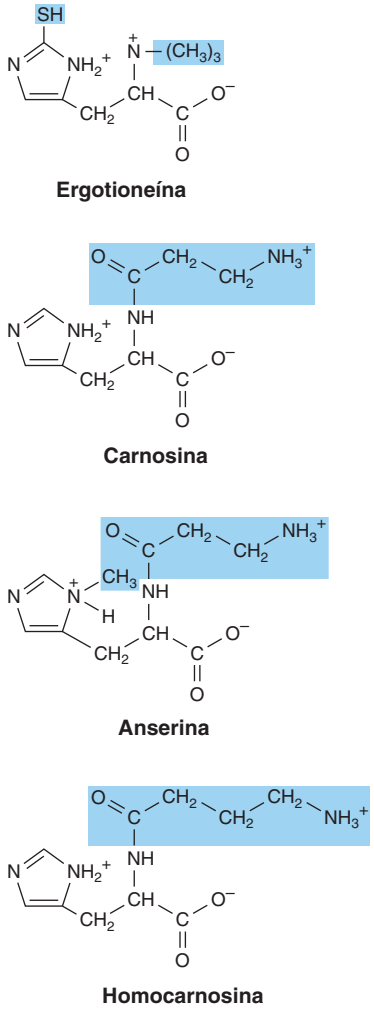


FIGURA 30-7 Derivados da histidina. Os quadros coloridos contêm os componentes não derivados da histidina. O grupo SH da ergotioneína deriva da cisteína.

alta concentração tecidual de metionina irá assegurar a síntese de quantidades adequadas de *S*-adenosilmetionina.

Após descarboxilação da *S*-adenosilmetionina pela metionina-descarboxilase, três carbonos e o grupo α-amino da metionina contribuem para a biossíntese das poliaminas, a espermina e a espermidina (**Figura 30-9**). Essas poliaminas atuam na proliferação e no crescimento das células, são fatores de crescimento para células de mamíferos em cultura e estabilizam células intactas, organelas subcelulares e membranas. As poliaminas em doses farmacológicas são hipotérmicas e hipotensoras. Como apresentam múltiplas cargas positivas, as poliaminas associam-se prontamente ao DNA e ao RNA. A Figura 30-9 fornece um resumo da biossíntese das poliaminas a partir da metionina e da ornitina, enquanto a **Figura 30-10** apresenta o catabolismo das poliaminas.

Serina

A serina participa na biossíntese da esfingosina (ver Capítulo 24), bem como das purinas e pirimidinas, onde fornece os carbonos

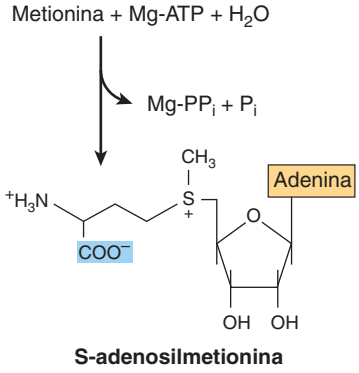


FIGURA 30-8 Biossíntese da *S*-adenosilmetionina, catalisada pela metionina adenosiltransferase.

2 e 8 das purinas e o grupo metila da timina (ver Capítulo 33). Defeitos genéticos na cistationina-β-sintase, proteína heme que catalisa a condensação dependente de piridoxal-5′-fosfato da serina com a homocisteína para formar a cistationina, resultam em **homocistinúria.**

$$\text{Serina} + \text{Homocisteína} \rightarrow \text{Cistationina} + H_2O$$

Triptofano

Após hidroxilação do triptofano em 5-hidroxitriptofano pela tirosina-hidroxilase hepática, a descarboxilação subsequente forma serotonina (5-hidroxitriptamina), um potente vasoconstritor e estimulador da contração do músculo liso. O catabolismo da serotonina é iniciado pela desaminação oxidativa em 5-hidroxindol-3-acetato, em uma reação catalisada pela monoamina-oxidase (**Figura 30-11**). A estimulação psíquica que ocorre após a administração de iproniazida resulta de sua capacidade de prolongar a ação da serotonina por meio da inibição da monoamina-oxidase. No carcinoide (argentafinoma), as células tumorais produzem serotonina em excesso. Os metabólitos urinários da serotonina em pacientes com carcinoide incluem glicuronídeo de *N*-acetilserotonina e o conjugado de glicina do 5-hidroxindolacetato. A serotonina e a 5-metoxitriptamina são metabolizadas aos ácidos correspondentes pela monoamina-oxidase. A *N*-acetilação da serotonina, seguida de sua *O*-metilação na glândula pineal, forma a melatonina. A melatonina circulante é captada por todos os tecidos, incluindo o cérebro, porém é rapidamente metabolizada por hidroxilação, seguida de conjugação com sulfato ou com ácido glicurônico. O tecido renal, o tecido hepático e as bactérias fecais convertem o triptofano em triptamina e, a seguir, em indol-3-acetato. Os principais catabólitos urinários normais do triptofano são o 5-hidroxindolacetato e o indol-3-acetato.

Tirosina

As células neurais convertem a tirosina em epinefrina e norepinefrina (**Figura 30-12**). Embora a dopa também seja um intermediário na formação da melanina, a tirosina é hidroxilada por diferentes enzimas nos melanócitos. A dopa-descarboxilase,

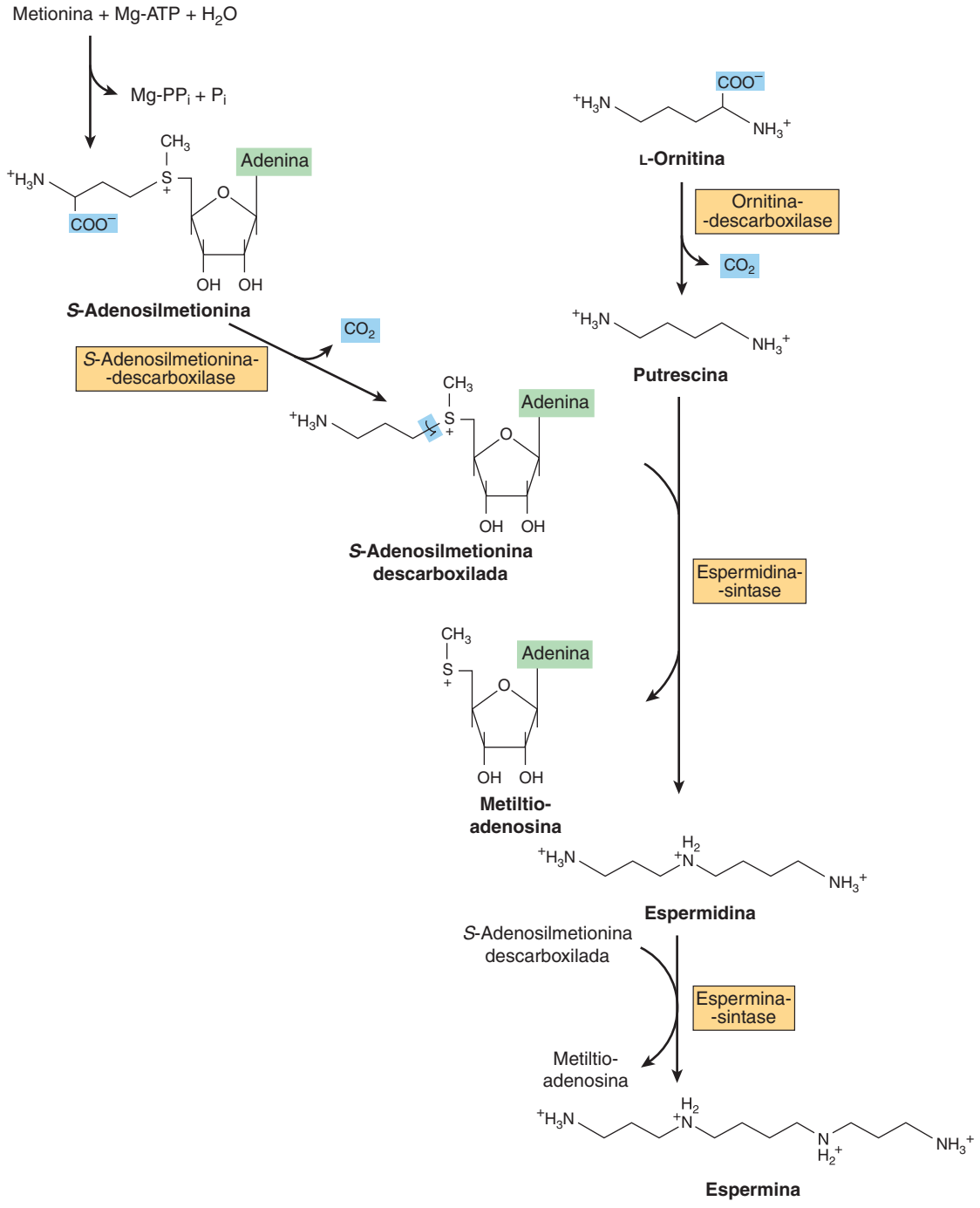


FIGURA 30-9 Intermediários e enzimas que participam da biossíntese da espermidina e da espermina.

enzima dependente de piridoxal-fosfato, forma dopamina. A hidroxilação subsequente pela dopamina-β-oxidase forma, em seguida, norepinefrina. Na medula suprarrenal, a feniletanolamina-*N*-metiltransferase utiliza a *S*-adenosilmetionina para metilar a amina primária da norepinefrina, produzindo epinefrina (Figura 30-12). A tirosina também é um precursor da tri-iodotironina e da tiroxina (ver Capítulo 41).

Fosfosserina, fosfotreonina e fosfotirosina

A fosforilação e a desfosforilação de resíduos específicos de seril, treonil ou tirosil de proteínas regulam a atividade de certas enzimas do metabolismo dos lipídeos e dos carboidratos (ver Capítulos 9 e 19 a 26), bem como de proteínas que participam de cascatas de transdução de sinais (ver Capítulo 42).

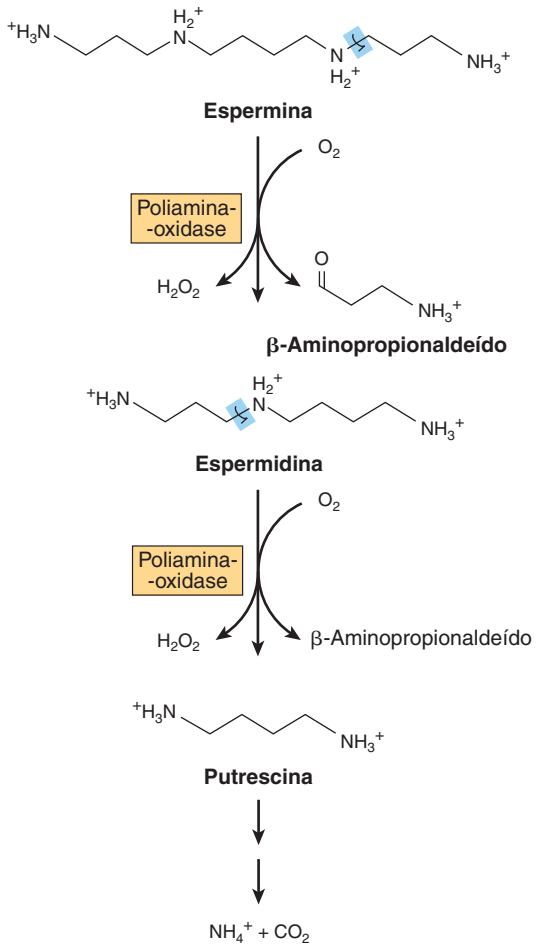


FIGURA 30-10 Catabolismo das poliaminas.

Sarcosina (*N*-metilglicina)

A biossíntese e o catabolismo da sarcosina (*N*-metilglicina) ocorrem nas mitocôndrias. A formação da sarcosina a partir da dimetilglicina é catalisada pela flavoproteína dimetilglicina-desidrogenase, que exige a presença de pteroilpentaglutamato (TPG) reduzido.

$$\text{Dimetilglicina} + \text{FADH}_2 + \text{H}_4\text{TPG} + \text{H}_2\text{O}$$
$$\rightarrow \text{Sarcosina} + \textit{N}\text{-formil-TPG}$$

Traços de sarcosina também podem ser produzidos por metilação da glicina, reação catalisada pela *S*-adenosilmetionina glicina-metiltransferase.

$$\text{Glicina} + \textit{S}\text{-Adenosilmetionina} \rightarrow \text{Sarcosina} + \textit{S}\text{-Adenosil-homocisteína}$$

O catabolismo da sarcosina em glicina, catalisado pela flavoproteína sarcosina-desidrogenase, também requer TPG reduzido.

$$\text{Sarcosina} + \text{FAD} + \text{H}_4\text{TPG} + \text{H}_2\text{O}$$
$$\rightarrow \text{Glicina} + \text{FADH}_2 + \textit{N}\text{-formil-TPG}$$

As reações de desmetilação que formam e degradam a sarcosina representam importantes fontes de unidades de um carbono. O $FADH_2$ é reoxidado por meio da cadeia de transporte de elétrons (ver Capítulo 13).

Creatina e creatinina

A creatinina é formada nos músculos a partir da creatina-fosfato por desidratação não enzimática irreversível e perda do fosfato (**Figura 30-13**). Como a excreção de creatinina na urina de 24 horas é proporcional à massa muscular, ela fornece uma medida sobre a coleta completa de uma amostra de urina de 24 horas. A glicina, a arginina e a metionina participam da biossíntese de creatina. A síntese da creatina é concluída pela metilação do guanidoacetato pela *S*-adenosilmetionina (Figura 30-13).

AMINOÁCIDOS NÃO α

Os aminoácidos não α, encontrados nos tecidos sob a forma livre, incluem a β-alanina, o β-aminoisobutirato e o γ-aminobutirato (GABA). A β-alanina também está presente em forma combinada na coenzima A (ver Figura 44-18) e nos dipeptídeos β-alanil, carnosina, anserina e homocarnosina (ver adiante).

β-alanina e β-aminoisobutirato

A β-alanina e o β-aminoisobutirato são formados durante o catabolismo das piridiminas uracila e timina, respectivamente (ver Figura 33-9). Traços de β-alanina também são produzidos pela hidrólise de β-alanil dipeptídeos pela enzina carnosinase. O β-aminoisobutirato também é produzido pela transaminação do metilmalonato semialdeído, um catabólito da L-valina (ver Figura 29-24).

A reação inicial do catabolismo da β-alanina consiste em transaminação a malonato semialdeído. A transferência subsequente da coenzima A da succinil-CoA forma a malonil-CoA semialdeído, que é então oxidado a malonil-CoA e descarboxilado no intermediário anfibólico acetil-CoA. O catabolismo do β-aminoisobutirato é caracterizado por reações análogas. A transaminação forma metilmalonato semialdeído, que é convertido no intermediário anfibólico succinil-CoA pelas reações 8V e 9V da Figura 29-24. Os distúrbios do metabolismo da β-alanina e do β-aminobutirato decorrem de defeitos nas enzimas da via catabólica das pirimidinas. Entre os principais distúrbios, destacam-se os que resultam de uma deficiência total ou parcial da di-hidropirimidina-desidrogenase (ver Figura 33-9).

β-alanil dipeptídeos

Os β-alanil dipeptídeos, a carnosina e a anserina (*N*-metilcarnosina) (Figura 30-7), ativam a miosina ATPase, efetuam a quelação e aumentam a captação do cobre. O β-Alanil imidazol tampona o pH do músculo esquelético durante a contração anaeróbia. A biossíntese da carnosina é catalisada pela carnosina-sintetase por uma reação em duas etapas, que envolve a formação inicial de um acil-adenilato de β-alanina ligado à enzima e transferência subsequente da molécula β-alanil para a L-histidina.

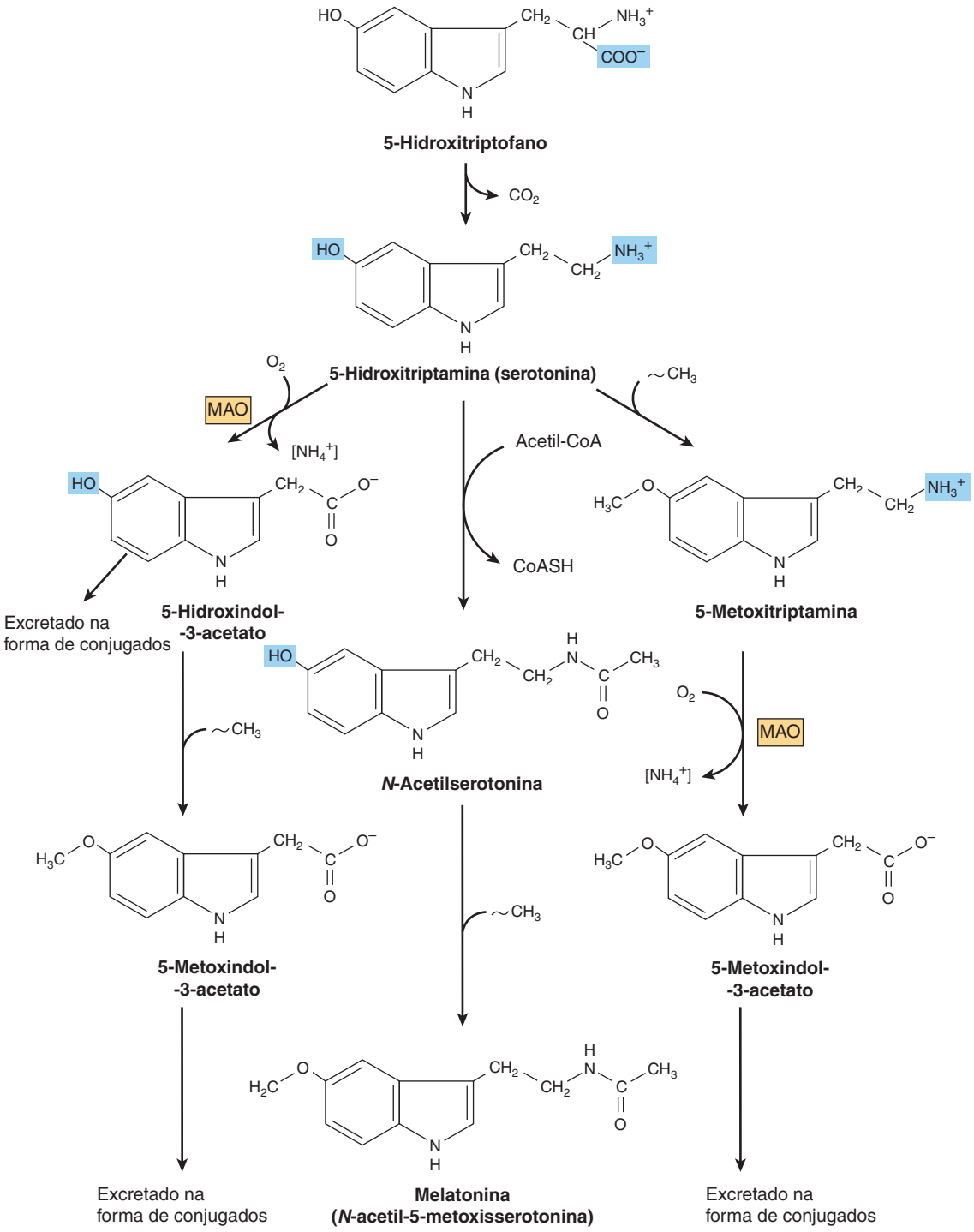


FIGURA 30-11 Biossíntese e metabolismo da serotonina e da melatonina. ([NH_4^+], por transaminação; MAO, monoaminoxidase; ~CH_3, proveniente da *S*-adenosilmetionina.)

$$\text{ATP} + \beta\text{-Alanina} \rightarrow \beta\text{-Alanil-AMP} + PP_i$$

$$\beta\text{-Alanil-AMP} + \text{L-Histidina} \rightarrow \text{Carnosina} + \text{AMP}$$

A hidrólise da carnosina em β-alanina e L-histidina é catalisada pela carnosinase. O distúrbio hereditário de deficiência de carnosinase caracteriza-se por **carnosinúria.**

A homocarnosina (Figura 30-7), presente no cérebro humano em níveis mais altos do que a carnosina, é sintetizada no tecido cerebral pela carnosina-sintetase. A carnosinase sérica não hidrolisa a homocarnosina. A **homocarnosinose**, raro distúrbio genético, está associada à paraplegia espástica progressiva e ao retardo mental.

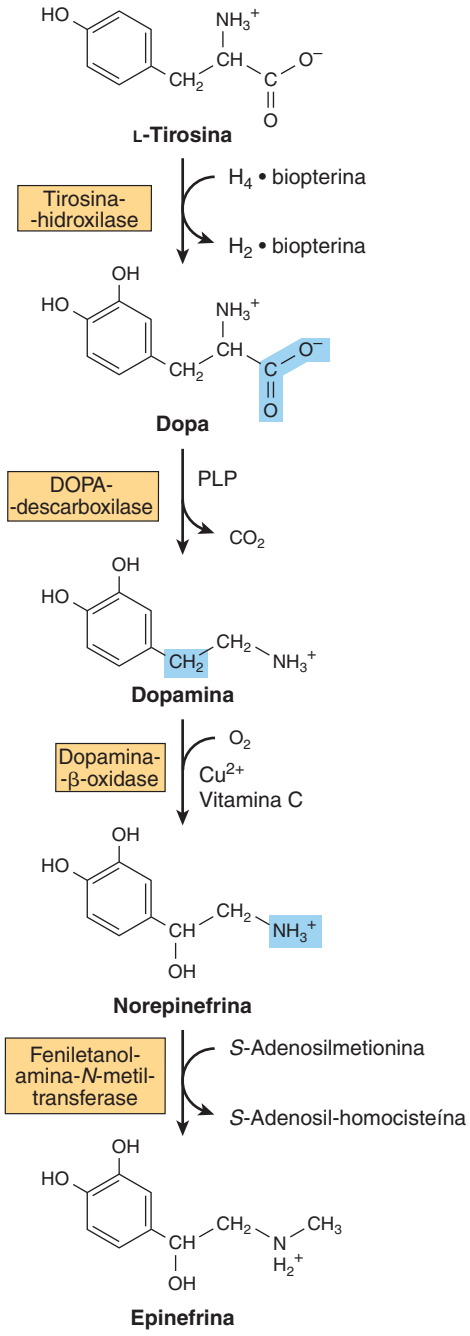


FIGURA 30-12 Conversão da tirosina em epinefrina e norepinefrina nas células neuronais e suprarrenais. (PLP, piridoxal-fosfato.)

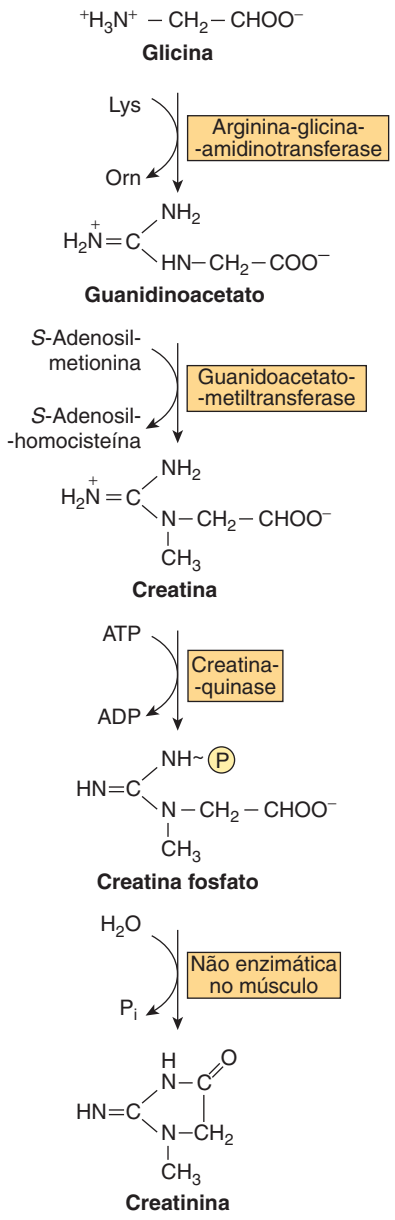


FIGURA 30-13 Biossíntese da creatina e da creatinina. A conversão da glicina e do grupo guanidino da arginina em creatina e creatina-fosfato. A figura também mostra a hidrólise não enzimática da creatina-fosfato em creatinina.

γ-Aminobutirato

O γ-aminobutirato (GABA) atua no tecido cerebral como neurotransmissor inibitório, alterando as diferenças de potencial transmembrana. O GABA é gerado pela descarboxilação do glutamato, em uma reação catalisada pela L-glutamato-descarboxilase (**Figura 30-14**). A transaminação do γ-aminobutirato produz o succinato semialdeído, que pode ser reduzido a γ-hidroxibutirato pela L-lactato-desidrogenase, ou oxidado a succinato e, em seguida, por meio do ciclo do ácido cítrico, a CO_2 e H_2O (Figura 30-14). Um raro distúrbio genético do metabolismo do GABA caracteriza-se por uma anormalidade da GABA aminotransferase, uma enzima que participa do catabolismo do GABA após a sua liberação pós-sináptica no tecido cerebral. Defeitos na succinato semialdeído-desidrogenase (Figura 30-14) são responsáveis por outro distúrbio metabólico raro do catabolismo do γ-aminobutirato, caracterizado por **acidúria 4-hidroxibutírica**.

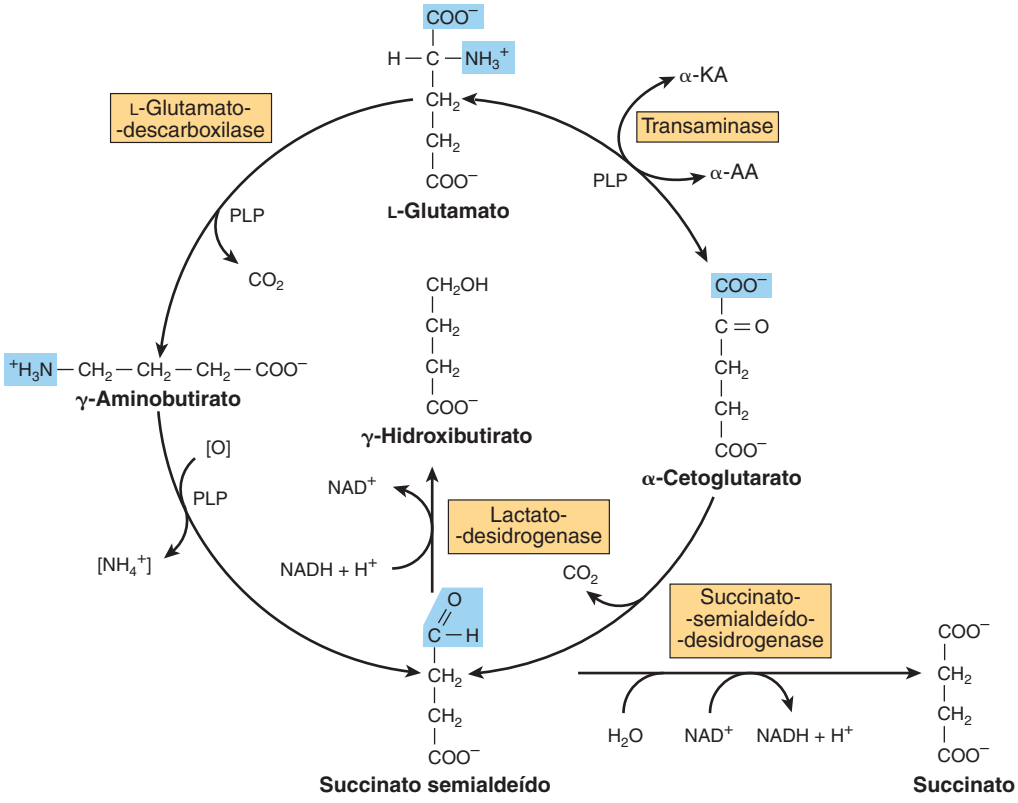


FIGURA 30-14 Metabolismo do γ-aminobutirato. (α-KA, α-cetoácidos; α-AA, α-aminoácidos; PLP, piridoxal-fosfato.)

RESUMO

- Além de desempenhar papéis estruturais e funcionais nas proteínas, os α-aminoácidos participam de uma grande variedade de outros processos de biossíntese.
- A arginina fornece o grupo formamidina da creatina e o nitrogênio do NO. Por meio da ornitina, a arginina fornece o esqueleto das poliaminas putrescina, espermina e espermidina.
- A cisteína fornece a porção tioetanolamina da coenzima A e, após a sua conversão em taurina, parte do ácido biliar, o ácido taurocólico.
- A glicina participa na biossíntese do heme, das purinas, da creatina e da *N*-metilglicina (sarcosina). Muitos fármacos e seus metabólitos são excretados sob a forma de conjugados de glicina, aumentando a sua solubilidade em água para excreção urinária.
- A descarboxilação da histidina forma o neurotransmissor histamina. Os compostos de histidina encontrados no corpo humano incluem a ergotioneína, a carnosina e a anserina dietética.
- A *S*-adenosilmetionina, que constitui a principal fonte de grupos metil no metabolismo, contribui com o seu esqueleto de carbono na biossíntese das poliaminas espermina e espermidina.
- Além de suas funções na biossíntese de fosfolipídeos e esfingosina, a serina fornece os carbonos 2 e 8 das purinas e o grupo metil da timina.
- Os principais metabólitos do triptofano incluem a serotonina e a melatonina. Os tecidos renal e hepático, bem como as bactérias fecais, convertem o triptofano em triptamina e, a seguir, em indol-3-acetato. Os principais catabólitos do triptofano na urina são o indol-3-acetato e o 5-hidroxindolacetato.
- A tirosina forma a norepinefrina e a epinefrina e, após iodação, os hormônios tireoidianos, a tri-iodotironina e a tiroxina.
- A interconversão catalisada por enzima das formas fosfo e desfosfo da serina, treonina e tirosina ligadas a peptídeos desempenha um papel essencial na regulação metabólica, inclusive na transdução de sinais.
- A glicina, a arginina e a *S*-adenosilmetionina participam na biossíntese da creatina que, na forma de creatina-fosfato, atua como importante reserva de energia nos tecidos muscular e cerebral. A excreção de seu catabólito creatina na urina é proporcional à massa muscular.
- A β-Alanina e o β-aminoisobutirato estão presentes nos tecidos na forma de aminoácidos livres. A β-Alanina também ocorre na forma ligada na coenzima A, carnosina, anserina e homocarnosina. O catabolismo da β-alanina envolve a

conversão sequencial em acetil-CoA. O β-aminoisobutirato é catabolizado em succinil-CoA por reações análogas. Os distúrbios do metabolismo da β-alanina e do β-aminoisobutirato surgem em decorrência de defeitos nas enzimas do catabolismo das pirimidinas.

- A descarboxilação do glutamato forma o neurotransmissor inibitório, o γ-aminobutirato (GABA). Dois distúrbios metabólicos raros estão associados a defeitos no catabolismo do GABA.

REFERÊNCIAS

Conti M, Beavo J: Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. Annu Rev Biochem 2007; 76:481.

Dominy JE Jr, Hwang J, Guo S, et al: Synthesis of cysteine dioxygenase's amino acid cofactor is regulated by substrate and represents a novel post-translational regulation of activity. J Biol Chem 2008;283:12188.

Joseph CA, Maroney MJ: Cysteine dioxygenase: structure and mechanism. Chem Commun (Camb) 2007;28:3338.

Lindemose S, Nielsen PE, Mollegaard NE: Polyamines preferentially interact with bent adenine tracts in double-stranded DNA. Nucleic Acids Res 2005;33:1790.

Manegold C, Hoff mann GF, Degen I, et al: Aromatic L-amino acid decarboxylase defi ciency: clinical features, drug therapy and followup. J Inherit Metab Dis 2009;32:371.

Moinard C, Cynober L, de Bandt JP: Polyamines: metabolism and implications in human diseases. Clin Nutr 2005;24:184.

Pearl PL, Gibson KM, Cortez MA, et al: Succinic semialdehyde dehydrogenase defi ciency: Lessons from mice and men. J Inherit Metab Dis 2009;32:343.

Pearl PL, Taylor JL, Trzcinski S, et al: The pediatric neurotransmitter disorders. J Child Neurol 2007;22:606.

Scriver CR, Sly WS, Childs B, et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill, 2001.

Wu F, Yu J, Gehring H. Inhibitory and structural studies of novel coenzyme-substrate analogs of human histidine decarboxylase. FASEB J. 2008;3:890.

CAPÍTULO

31

Porfirinas e Pigmentos Biliares

Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Conhecer a relação entre as porfirinas e o heme.
- Saber como o heme é sintetizado.
- Compreender as causas e os quadros clínicos gerais das várias porfirias.
- Saber como a bilirrubina origina-se do heme e como ela é processada no corpo.
- Compreender a natureza da icterícia e reconhecer como tratá-la, determinando a sua causa em um paciente.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A bioquímica das porfirinas e dos pigmentos biliares é apresentada neste capítulo. Esses tópicos estão estreitamente relacionados, visto que o heme é sintetizado a partir das porfirinas e do ferro, enquanto os produtos de degradação do heme consistem nos pigmentos biliares e no ferro.

O conhecimento da bioquímica das porfirinas e do heme é fundamental para compreender as diversas funções das **hemoproteínas** (ver adiante) no organismo. As **porfirias** constituem um grupo de doenças causadas por anormalidades na via de biossíntese das várias porfirinas. Embora as porfirias não sejam muito prevalentes, os médicos precisam estar atentos à sua existência. A **icterícia** é um distúrbio clínico muito mais prevalente, devido à elevação da bilirrubina no plasma. Esse aumento é causado pela produção excessiva de bilirrubina ou pela incapacidade de sua excreção e ocorre em numerosas doenças, incluindo desde anemias hemolíticas até hepatites virais e câncer de pâncreas.

AS METALOPORFIRINAS E AS HEMOPROTEÍNAS SÃO IMPORTANTES NA NATUREZA

As **porfirinas** são compostos cíclicos formados pela ligação de quatro anéis pirrólicos por meio de pontes de metino (=HC−) (**Figura 31-1**). Uma propriedade característica das porfirinas consiste na formação de complexos com íons metálicos ligados ao átomo de nitrogênio dos anéis pirrólicos. Exemplos são as **feroporfirinas**, como o **heme** da hemoglobina, e a porfirina **contendo magnésio**, a **clorofila**, que é o pigmento fotossintético dos vegetais.

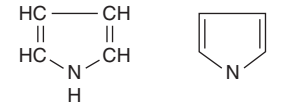
As proteínas que contêm heme (**hemoproteínas**) estão amplamente distribuídas na natureza. A **Tabela 31-1** fornece exemplos de sua importância nos seres humanos e nos animais.

As porfirinas naturais apresentam cadeias laterais substituintes no núcleo de porfirina

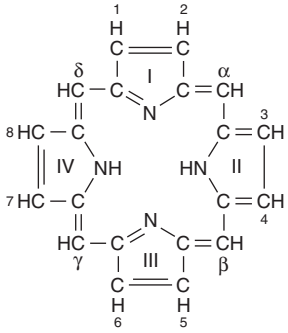
As **porfirinas** encontradas na natureza são compostos nos quais diversas **cadeias laterais** substituem os oito átomos de hidrogênio numerados no núcleo da porfirina, como ilustrado na Figura 31-1. Como forma simples de demonstrar essas substituições, Hans Fischer propôs uma fórmula abreviada, na qual as fontes de metino são omitidas, e cada anel pirrólico é apresentado conforme elucidado na **Figura 31-2**, com as oito posições substituintes numeradas conforme indicado. Várias porfirinas estão ilustradas na **Figuras 31-2**, **31-3** e **31-4**.

O arranjo dos substituintes acetato (A) e propionato (P) na uroporfirina, ilustrado na Figura 31-2, é assimétrico (no anel IV, a sequência esperada dos substituintes A e P é invertida). Uma porfirina com esse tipo de **substituição assimétrica** é classificada como porfirina do **tipo III**. Uma porfirina com arranjo totalmente simétrico dos substituintes é classificada como porfirina do **tipo I**. Apenas os tipos I e III são encontrados na natureza, e a série do tipo III é muito mais abundante (Figura 31-3) e mais importante, visto que ela inclui o heme.

O **heme** e o seu precursor imediato, a **protoporfirina IX** (Figura 31-4) são porfirinas do **tipo III** (i.e., com distribuição



Pirrol



Porfirina
($C_{20}H_{14}N_4$)

FIGURA 31-1 A molécula de porfirina. Os anéis são numerados como I, II, III e IV. As posições dos substituintes nos anéis são designadas pelos números 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8. As pontes de metino (=HC−) são designadas pelas letras α, β, γ e δ. O sistema de numeração utilizado é o de Hans Fischer.

assimétrica dos grupos metila, como na coproporfirina do tipo III). Entretanto, ambos são algumas vezes identificados como pertencentes à série IX, visto que foram incluídos em nono lugar em uma série de isômeros postulados por Hans Fischer, o pesquisador pioneiro no campo da química das porfirinas.

O HEME É SINTETIZADO A PARTIR DA SUCCINIL-COA E DA GLICINA

Nas células dos seres vivos, o **heme** é sintetizado por uma via que foi muito bem estudada. Os dois compostos iniciais são a **succinil-CoA**, derivada do ciclo do ácido cítrico nas mitocôndrias, e o aminoácido **glicina**. O **piridoxal-fosfato** também é necessário nessa reação para "ativar" a glicina. O produto da reação de condensação entre a succinil-CoA e a glicina é o **ácido α-amino-β--cetoadípico**, que é rapidamente descarboxilado para formar **δ-aminolevulinato** (ALA) (**Figura 31-5**). Essa sequência de reação é catalisada pela **ALA-sintase**, a enzima de controle de velocidade na biossíntese das porfirinas no fígado dos mamíferos. A síntese de ALA ocorre nas **mitocôndrias**. No citosol, duas moléculas de ALA são condensadas pela enzima **ALA-desidratase** para formar duas moléculas de água e uma de **porfobilinogênio** (PBG) (Figura 31-5). A ALA-desidratase, enzima contendo zinco, é sensível à inibição pelo **chumbo**, como pode ocorrer na intoxicação por chumbo.

TABELA 31-1 Exemplos de algumas hemoproteínas importantes nos seres humanos e nos animais[1]

Proteína	Função
Hemoglobina	Transporte de oxigênio no sangue
Mioglobina	Armazenamento de oxigênio no músculo
Citocromo *c*	Participação na cadeia de transporte de elétrons
Citocromo P450	Hidroxilação dos xenobióticos
Catalase	Degradação do peróxido de hidrogênio
Triptofano pirrolase	Oxidação do triptofano

[1]As funções das proteínas citadas estão descritas em vários capítulos deste livro.

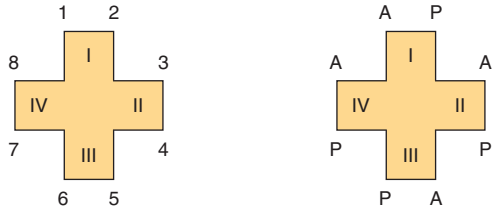


FIGURA 31-2 Uroporfirina III. (A [acetato] = $-CH_2COOH$; P [propionato] = $-CH_2CH_2COOH$.) Observe a assimetria dos substituintes no anel IV (ver o texto).

A formação de um **tetrapirrol cíclico** – isto é, uma porfirina – ocorre por condensação de quatro moléculas de PBG (**Figura 31-6**). Essas quatro moléculas condensam-se em uma disposição de cabeça-cauda para formar um tetrapirrol linear, o **hidroximetilbilano** (HMB). A reação é catalisada pela **uroporfirinogênio I--sintase**, também denominada PBG-desaminase ou HMB-sintase. O HMB sofre ciclização espontânea para formar o **uroporfirinogênio I** (lado esquerdo da Figura 31-6), ou é convertido em **uroporfirinogênio III** pela ação da **uroporfirinogênio III-sintase** (lado direito da Figura 31-6). Em condições normais, o uroporfirinogênio é quase exclusivamente o isômero III; todavia, em algumas das porfirias (discutidas adiante), os isômeros do tipo I dos porfirinogênios são produzidos em quantidades excessivas.

Convém observar que esses dois uroporfirinogênios possuem anéis pirrólicos ligados por **pontes de metileno** (—CH_2—) que não formam um sistema de anéis conjugados. Portanto, esses compostos são **incolores** (como todos os porfirinogênios). Entretanto, os porfirinogênios são prontamente auto-oxidados às suas respectivas porfirinas coloridas. Essas oxidações são catalisadas pela luz e pelas porfirinas formadas.

O uroporfirinogênio III é convertido em **coproporfirinogênio III** pela descarboxilação de todos os grupos de acetato (A), que os transforma em substituintes metila (M). A reação é catalisada pela **uroporfirinogênio-descarboxilase**, que também pode converter o uroporfirinogênio I em coproporfirinogênio I (**Figura 31-7**). Em seguida, o coproporfirinogênio III entra nas mitocôndrias, onde é convertido em **protoporfirinogênio III** e, a seguir, em **protoporfirina III**. Várias etapas estão envolvidas nessa conversão. A enzima mitocondrial **coproporfirinogênio--oxidase** catalisa a descarboxilação e a oxidação das duas cadeias laterais propiônicas para formar o protoporfirinogênio. Essa enzima é capaz de atuar apenas no coproporfirinogênio do tipo III, o que pode explicar por que as protoporfirinas do tipo I geralmente não ocorrem na natureza. A oxidação do protoporfirinogênio em **protoporfirina** é catalisada por outra enzima mitocon-

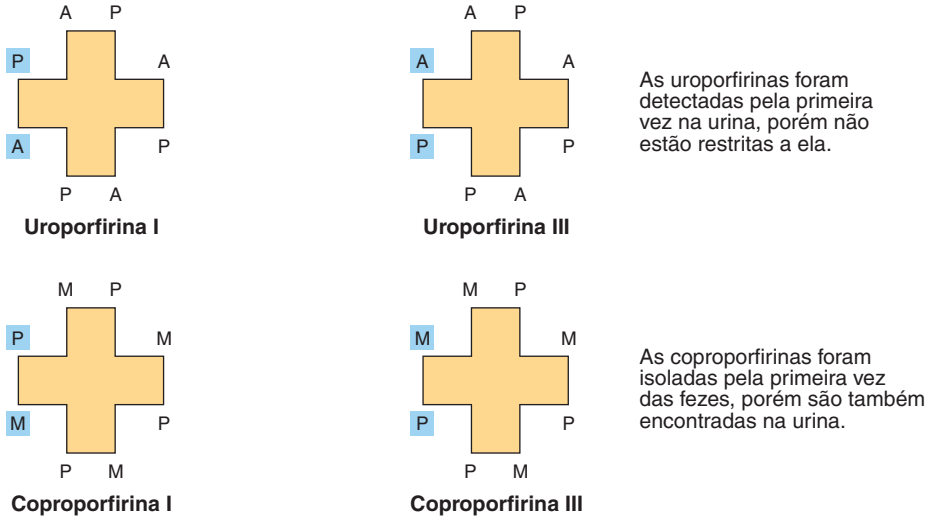


FIGURA 31-3 Uroporfirinas e coproporfirinas. (A, acetato; M, metil; P, propionato.)

drial, a **protoporfirinogênio-oxidase**. No fígado dos mamíferos, a conversão do coproporfirinogênio em protoporfirina requer a presença de oxigênio molecular.

A síntese do heme envolve a incorporação do ferro na protoporfirina

A etapa final na síntese do heme envolve a incorporação do ferro ferroso à protoporfirina por uma reação catalisada pela **ferroquelatase** (**heme-sintase**), outra enzima mitocondrial (Figura 31-4).

A **Figura 31-8** fornece um resumo das etapas da biossíntese dos derivados da porfirina a partir do PBG. As últimas três enzimas da via e a ALA-sintase estão localizadas nas **mitocôndrias,** enquanto as outras enzimas estão no **citosol.** São encontradas ambas as formas **eritroide** e **não eritroide** (*housekeeping,* manutenção) da **ALA-sintase**. A biossíntese do heme ocorre na maioria das células dos mamíferos, com exceção dos eritrócitos maduros, que carecem de mitocôndrias. No entanto, cerca de 85% da síntese do heme ocorre nas células precursoras eritroides da **medula óssea**, e a maior parte do restante, nos **hepatócitos**.

Os **porfirinogênios** descritos anteriormente são **incolores** e contêm seis átomos a mais de hidrogênio, em comparação com as porfirinas coloridas correspondentes. Essas **porfirinas reduzidas** (os porfirinogênios), e não as porfirinas correspondentes, são os verdadeiros intermediários na biossíntese da protoporfirina e do heme.

A ALA-sintase é a enzima reguladora essencial na biossíntese hepática do heme

A **ALA-sintase** ocorre nas formas tanto **hepática** (ALAS1) quanto **eritroide** (ALAS2). A reação limitadora de velocidade na síntese hepática do heme é catalisada pela ALAS1 (Figura 31-5), uma enzima reguladora. Verifica-se que o **heme**, provavelmente ao agir por meio de uma molécula aporrepressora, atua como **regulador negativo** da síntese de ALAS1. Esse mecanismo de repressão-desrepressão está ilustrado de modo esquemático na **Figura 31-9**. Dessa forma, a velocidade de síntese da ALAS1 aumenta acentuadamente na ausência do heme, enquanto diminui na sua presença. A taxa de renovação da ALAS1 no fígado do rato é normalmente rápida (meia-vida de cerca de 1 h), característica comum de uma enzima que catalisa uma reação limitadora de velocidade. O heme também afeta a tradução da enzima e a sua transferência do citosol para a mitocôndria.

Muitos **fármacos**, quando administrados a seres humanos, podem resultar em acentuado aumento da ALAS1. Esses fármacos são metabolizados, em sua maioria, por um sistema hepático que utiliza uma hemoproteína específica, denominada **citocromo P450** (ver Capítulo 53). Durante o seu metabolismo, a utili-

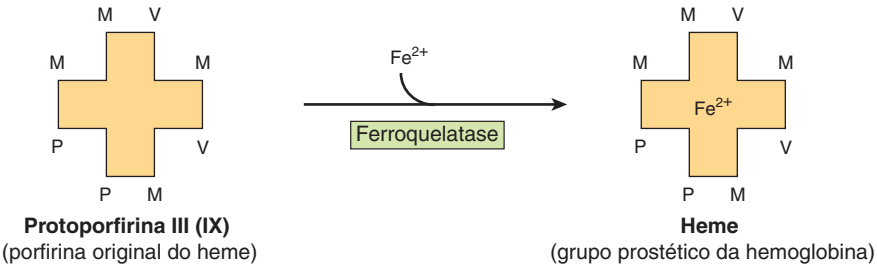


FIGURA 31-4 Adição do ferro à protoporfirina para formar o heme. (V [vinil] = $-CH=CH_2$.)

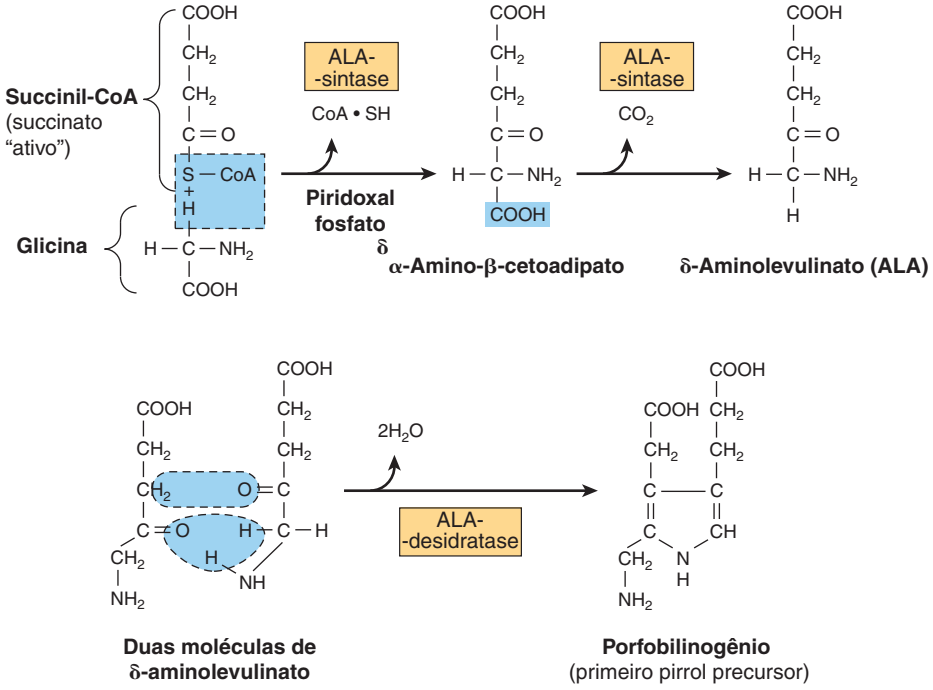


FIGURA 31-5 Biossíntese do porfobilinogênio. A ALA-sintase ocorre nas mitocôndrias, enquanto a ALA-desidratase é encontrada no citosol.

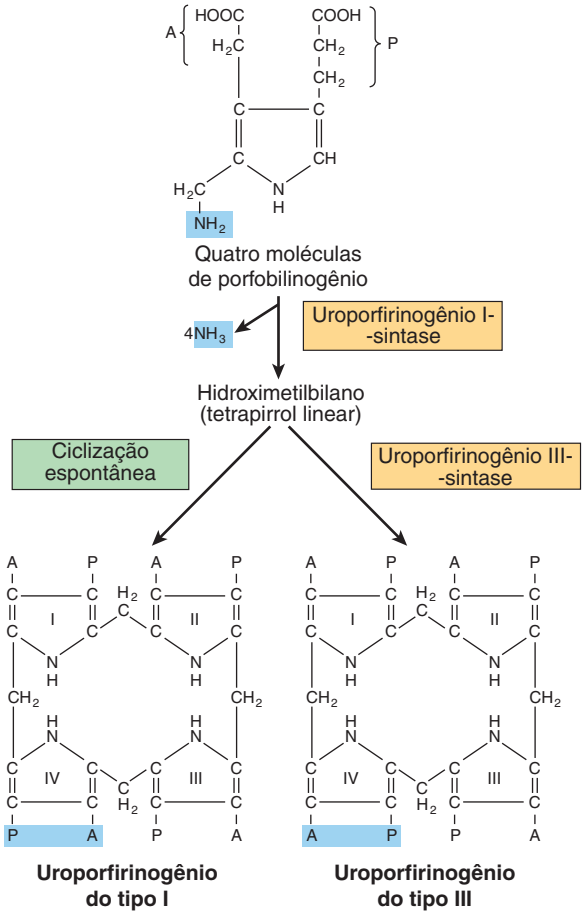


FIGURA 31-6 Conversão do porfobilinogênio em uroporfirinogênios. A uroporfirinogênio sintase I também é conhecida como porfobilinogênio (PBG) desaminase ou hidroximetilbilano (HMB) sintase.

zação do heme pelo citocromo P450 aumenta acentuadamente, o que, por sua vez, diminui a concentração intracelular do heme. Este último evento determina a desrepressão da ALAS1, com um aumento correspondente na taxa de síntese do heme para atender às necessidades das células.

Diversos fatores afetam a desrepressão da ALAS1 mediada por fármacos no fígado – por exemplo, a administração de **glicose** pode impedir esse efeito, assim como a administração de **hematina** (forma oxidada do heme).

A importância de alguns desses mecanismos reguladores é discutida de modo mais detalhado adiante, nas seções que descrevem as porfirias.

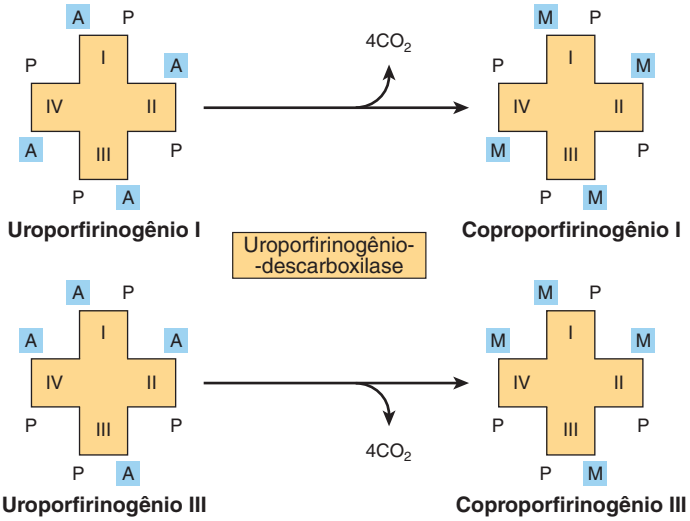


FIGURA 31-7 Descarboxilação dos uroporfirinogênios em coproporfirinogênios no citosol. (A, acetil; M, metil; P, propionil.)

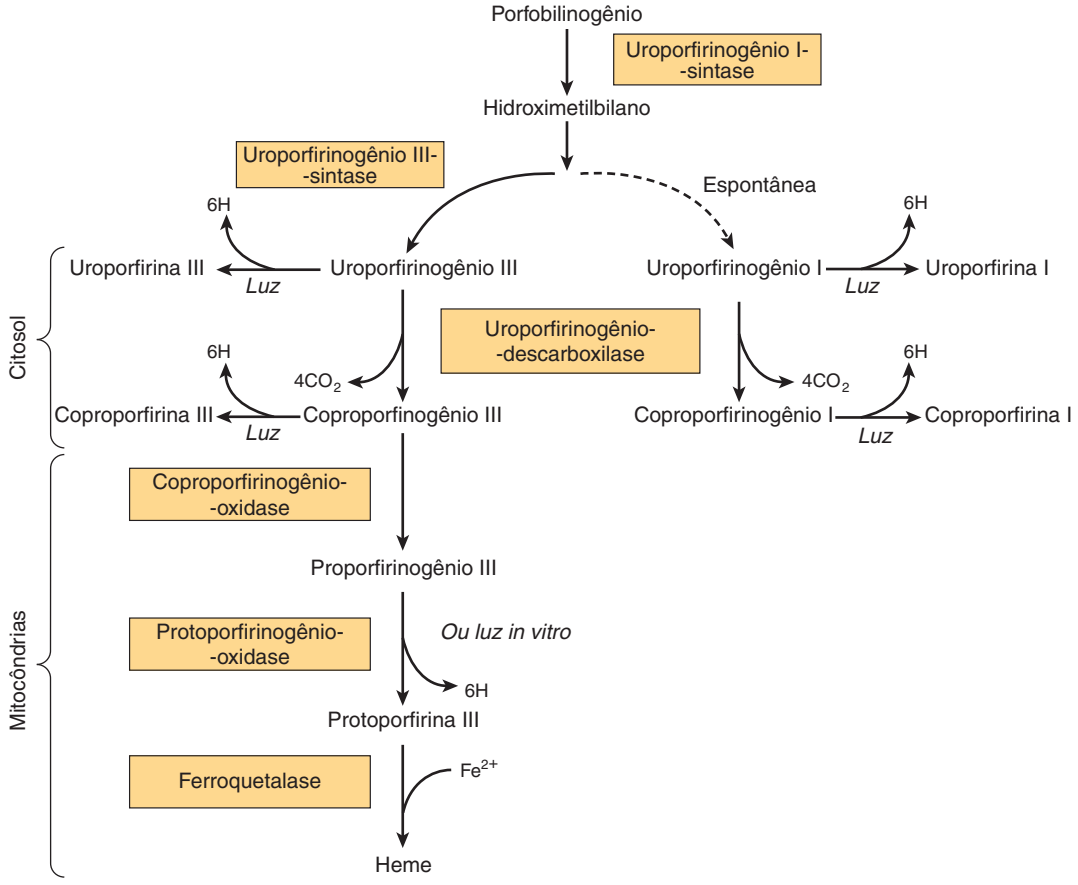


FIGURA 31-8 Etapas na biossíntese dos derivados das porfirinas a partir do porfobilinogênio. A uroporfirinogênio I-sintase é também conhecida como porfobilinogênio-desaminase ou hidroximetilbilano-sintase.

A regulação da forma **eritroide** da ALAS (ALAS2) difere daquela da ALAS1. Por exemplo, ela não é induzida pelos fármacos que afetam a ALAS1, e não sofre regulação por retroalimentação pelo heme.

AS PORFIRINAS SÃO COLORIDAS E EMITEM FLUORESCÊNCIA

Os diversos **porfirinogênios** são **incolores**, enquanto as várias **porfirinas** são todas **coloridas**. No estudo das porfirinas ou de seus derivados, o **espectro de absorção característico** exibido por cada composto – em ambas as regiões visível e ultravioleta do espectro – é de grande valor. Um exemplo é a curva de absorção de uma solução de porfirina em ácido clorídrico a 5% (**Figura 31-10**). Convém observar particularmente a faixa de absorção bem demarcada **em torno de 400 nm**. Trata-se de uma característica diferencial do anel de porfirina, que é típica de todas as porfirinas, independentemente das cadeias laterais presentes. Essa faixa é denominada **banda de Soret**, em homenagem ao físico francês, Charles Soret, que a descobriu.

Quando as porfirinas dissolvidas em ácidos minerais fortes ou em solventes orgânicos são iluminadas pela luz ultravioleta, elas emitem uma **fluorescência** vermelha intensa. Essa fluorescência é tão característica que é frequentemente utilizada para a detecção de pequenas quantidades de porfirinas livres. As **ligações duplas** que unem os anéis pirrólicos das porfirinas são responsáveis pela absorção e pela fluorescência características desses compostos; essas ligações duplas não são encontradas nos porfirinogênios.

Uma aplicação interessante das propriedades fotodinâmicas das porfirinas consiste em sua possível utilização no tratamento de determinados tipos de câncer, procedimento conhecido como **fototerapia do câncer**. Com frequência, os tumores captam mais porfirinas do que os tecidos normais. Assim, a **hematoporfirina** ou outros compostos relacionados são administrados a pacientes com tumores sensíveis. Em seguida, o tumor é exposto a um ***laser* de argônio**, que excita as porfirinas, produzindo efeitos citotóxicos.

A espectrofotometria é utilizada para quantificar as porfirinas e seus precursores

As **coproporfirinas** e as **uroporfirinas** possuem interesse clínico, uma vez que são excretadas em quantidades aumentadas nas porfirias. Esses compostos, quando presentes na urina ou nas fezes, podem ser separados por extração com misturas de solventes apropriados. Em seguida, podem ser identificados e quantificados usando métodos espectrofotométricos.

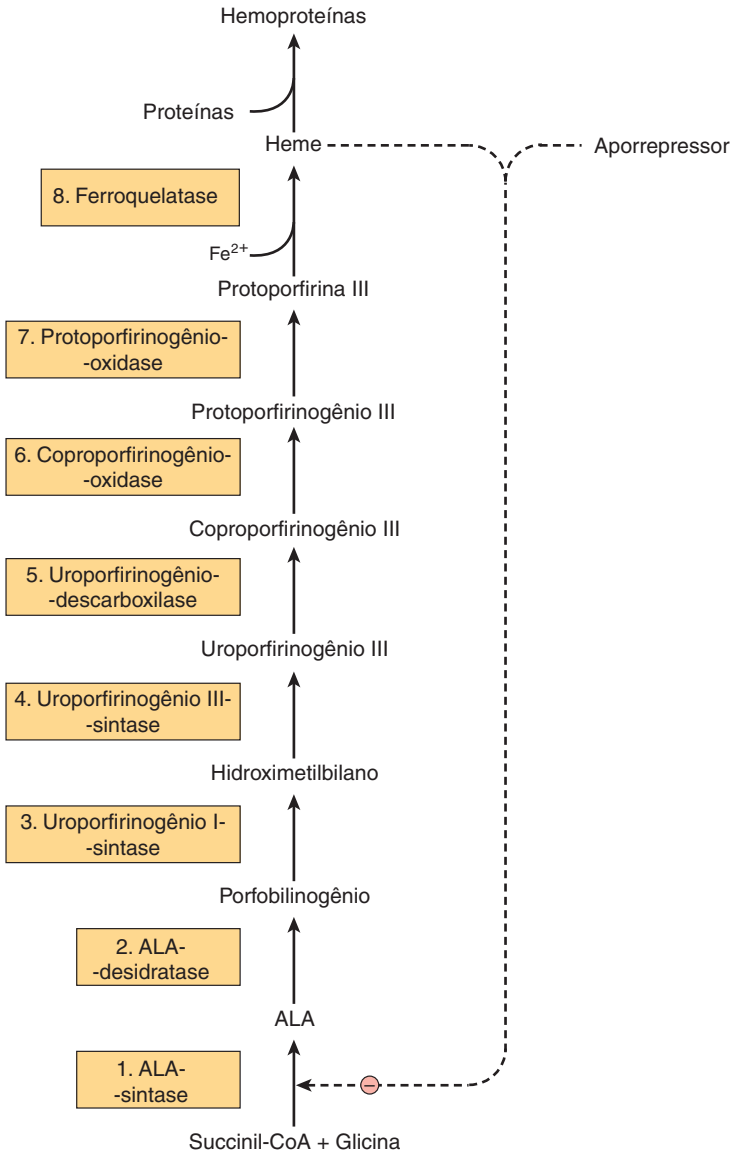


FIGURA 31-9 Intermediários, enzimas e regulação da síntese do heme. Os números das enzimas referem-se aos que estão na coluna 1 na Tabela 31-2. As enzimas 1, 6, 7 e 8 estão localizadas nas mitocôndrias, enquanto as demais estão no citosol. A ocorrência de mutações no gene que codifica a enzima 1 provoca anemia sideroblástica ligada ao X. As mutações nos genes que codificam as enzimas 2 a 8 causam as porfirias, embora tenham sido relatados apenas alguns casos devido à deficiência da enzima 2. A regulação da síntese hepática do heme ocorre na etapa da ALA-sintase (ALAS1) por um mecanismo de repressão-desrepressão mediado pelo heme e seu aporrepressor hipotético. As linhas pontilhadas indicam a regulação negativa (−) por repressão. A enzima 3 é também denominada porfobilinogênio-desaminase ou hidroximetilbilano-sintase.

A **ALA** e o **PBG** também podem ser determinados na urina por testes colorimétricos apropriados.

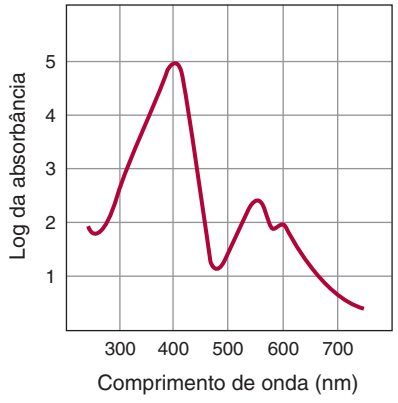


FIGURA 31-10 Espectro de absorção da hematoporfirina (solução a 0,01% em HCl a 5%.)

AS PORFIRIAS SÃO DISTÚRBIOS GENÉTICOS DO METABOLISMO DO HEME

As **porfirias** compreendem um grupo de distúrbios causados por anormalidades na via de biossíntese do heme e podem ser **genéticas** ou **adquiridas**. As porfirias não são prevalentes, porém é importante considerá-las em determinadas circunstâncias (p. ex., no diagnóstico diferencial da dor abdominal e de uma variedade de achados neuropsiquiátricos); caso contrário, os pacientes serão submetidos a tratamentos inapropriados. Foi especulado que o Rei George III tinha um tipo de porfiria, o que poderia explicar seus confinamentos periódicos no Castelo de Windsor e, talvez, algumas de suas ideias acerca dos colonizadores americanos.

TABELA 31-2 Resumo dos principais achados nas porfirias[1]

Enzima envolvida[2]	Tipo, classe e número do OMIM	Principais sinais e sintomas	Resultados dos exames laboratoriais
1. ALA-sintase (forma eritroide)	Anemia sideroblástica ligada ao X[3] (eritropoiética) (OMIM 301300)	Anemia	Baixas contagens de eritrócitos e níveis diminuídos de hemoglobina
2. ALA-desidratase	Deficiência de ALA desidratase (hepática) (OMIM 125270)	Dor abdominal, sintomas neuropsiquiátricos	Níveis urinários elevados de ALA e coproporfirina III
3. Uroporfirinogênio I--sintase[4]	Porfiria intermitente aguda (hepática) (OMIM 176000)	Dor abdominal, sintomas neuropsiquiátricos	Níveis urinários elevados de ALA e PBG
4. Uroporfirinogênio III--sintase	Porfiria eritropoiética congênita (eritropoiética) (OMIM 263700)	Fotossensibilidade	Níveis elevados de uroporfirinas I urinária, fecal e eritrocitária
5. Uroporfirinogênio--descarboxilase	Porfiria cutânea tardia (hepática) (OMIM 176100)	Fotossensibilidade	Níveis urinários elevados de uroporfirina I
6. Coproporfirinogênio--oxidase	Coproporfiria hereditária (hepática) (OMIM 121300)	Fotossensibilidade, dor abdominal, sintomas neuropsiquiátricos	Níveis urinários elevados de ALA, PBG e coproporfirina III, e níveis fecais aumentados de coproporfirina III
7. Protoporfirinogênio--oxidase	Porfiria variegata (hepática) (OMIM 176200)	Fotossensibilidade, dor abdominal, sintomas neuropsiquiátricos	Níveis urinários elevados de ALA, PBG e coproporfirina III, e níveis fecais aumentados de protoporfirina IX
8. Ferroquelatase	Protoporfiria (eritropoiética) (OMIM 177000)	Fotossensibilidade	Níveis fecais e eritrocitários elevados de protoporfirina IX

[1]Apenas os achados bioquímicos nos estágios ativos dessas doenças são listados. Algumas anormalidades bioquímicas podem ser detectadas nos estágios latentes de alguns dos distúrbios listados. Os distúrbios 3, 5 e 8 são, em geral, as porfirias mais prevalentes. O distúrbio 2 é raro.
[2]A numeração das enzimas nesta tabela corresponde àquela usada na Figura 31-9.
[3]A anemia sideroblástica ligada ao X não é uma porfiria, porém está incluída aqui devido à ALA-sintase envolvida.
[4]Essa enzima é também denominada PBG-desaminase ou hidroximetilbilano sintase.
Abreviaturas: ALA, ácido δ-aminolevulínico; PBG, porfobilinogênio.

Além disso, a **fotossensibilidade** (que favorece atividades noturnas) e a severa **desfiguração** apresentada por alguns pacientes com porfiria eritropoética congênita levaram à hipótese de que esses indivíduos podem ter sido os protótipos dos denominados **lobisomens**. Não foi apresentada nenhuma evidência para sustentar essa suposição.

A bioquímica fornece o fundamento para as causas, o diagnóstico e o tratamento das porfirias

Foram descritos seis tipos principais de **porfiria**, que resultam da depressão das atividades das enzimas 3 a 8 ilustradas na Figura 31-9 (ver também a **Tabela 31-2**). Por esse motivo, o ensaio da atividade de uma ou mais dessas enzimas utilizando uma amostra apropriada (p. ex., eritrócitos) é importante para estabelecer um diagnóstico definitivo nos casos suspeitos de porfiria. Os indivíduos com baixa atividade da enzima 1 (ALAS2) desenvolvem anemia, mas não porfiria (ver Tabela 31-2). Foram descritos pacientes com baixa atividade da enzima 2 (ALA-desidratase), porém em casos muito raros; o distúrbio resultante é denominado porfiria por deficiência de ALA-desidratase.

Em geral, as porfirias descritas são **herdadas** como caráter autossômico dominante, com exceção da porfiria eritropoética congênita, que é herdada de modo recessivo. Em alguns casos, foram estabelecidas as anormalidades específicas dos genes que controlam a síntese das enzimas envolvidas na biossíntese do heme. Dessa maneira, o uso de sondas de genes apropriadas possibilitou o **diagnóstico pré-natal** de algumas das porfirias.

À semelhança da maioria dos **erros inatos**, os sinais e sintomas da porfiria resultam de uma **deficiência** de produtos metabólicos situados após o bloqueio enzimático, ou do **acúmulo** dos metabólitos localizados antes do bloqueio.

Se a lesão enzimática ocorrer em uma etapa **inicial** da via, antes da formação dos porfirinogênios (p. ex., enzima 3 da Figura 31-9, que está afetada na porfiria intermitente aguda), ocorrerá acúmulo de **ALA** e **PBG** nos tecidos e líquidos corporais (**Figura 31-11**). Clinicamente, os pacientes queixam-se de **dor abdominal** e de **sintomas neuropsiquiátricos**. A causa bioquímica exata desses sintomas ainda não foi determinada, mas pode estar relacionada com os níveis elevados de ALA ou de PBG, ou com uma deficiência de heme.

Por outro lado, os bloqueios enzimáticos em etapas **mais** avançadas da via resultam em **acúmulo dos porfirinogênios** indicados nas Figuras 31-9 e 31-11. Seus produtos de oxidação, os derivados porfirínicos correspondentes, causam **fotossensibilidade**, uma reação à luz visível em torno de 400 nm. Acredita-se que as porfirinas, quando expostas à luz com esse comprimento de onda, se tornam "excitadas" e, em seguida, reagem com o oxigênio molecular para formar radicais de oxigênio, que causam **lesão dos lisossomos** e de outras organelas. Os lisossomos lesionados liberam suas enzimas de degradação, causando graus variáveis de lesão cutânea, incluindo cicatrização.

As porfirias podem ser **classificadas** com base nos **órgãos ou** nas **células** mais afetados. Em geral, são órgãos ou células nos quais a síntese de heme é particularmente ativa. A **medula óssea** sintetiza quantidades consideráveis de hemoglobina, enquanto o **fígado** é ativo na síntese de outra hemoproteína,

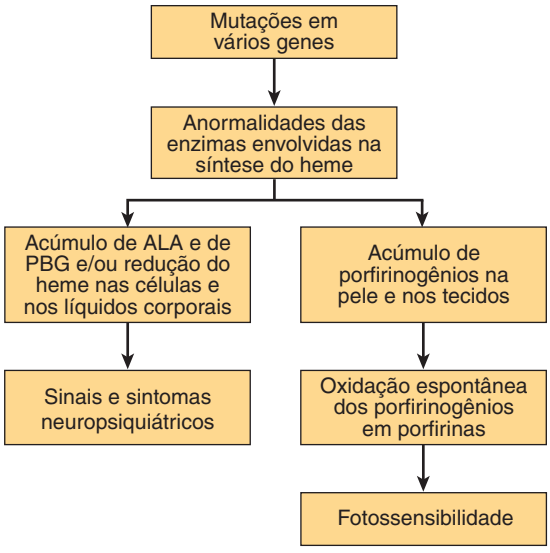


FIGURA 31-11 Causas bioquímicas dos principais sinais e sintomas das porfirias.

o citocromo P450. Portanto, uma das formas de classificar as porfirias consiste em designá-las como predominantemente **eritropoiéticas** ou **hepáticas**; as porfirias incluídas nessas duas classes são assim caracterizadas na Tabela 31-2. As porfirias também podem ser classificadas em **agudas** ou **cutâneas**, com base em suas manifestações clínicas. Por que alguns tipos específicos de porfiria acometem determinados órgãos mais acentuadamente do que outros? Uma resposta parcial é que os níveis dos metabólitos que causam lesão (p. ex., ALA, PBG, porfirinas específicas ou ausência de heme) podem variar significativamente em diferentes órgãos ou células, dependendo das diferentes atividades de suas enzimas envolvidas na formação do heme.

Conforme descrito anteriormente, a **ALAS1** constitui a enzima reguladora essencial da via de biossíntese do heme no fígado. Numerosos **fármacos** (p. ex., barbitúricos, griseofulvina) induzem a enzima. A maioria desses fármacos produz esse efeito pela indução do citocromo P450 (ver Capítulo 53), que utiliza o heme e, portanto, causa desrepressão (indução) da ALAS1. Nos pacientes com porfiria, a atividade aumentada da ALAS1 resulta em níveis elevados de precursores potencialmente tóxicos do heme situados antes do bloqueio metabólico. Dessa forma, a administração de **fármacos que provocam indução do citocromo P450** (os denominados indutores microssomais) pode precipitar episódios de porfiria.

O **diagnóstico** de um tipo específico de porfiria geralmente pode ser estabelecido pela análise das **histórias clínica** e **familiar**, **exame físico** e **exames laboratoriais** apropriados. A Tabela 31-2 apresenta os achados mais importantes nos seis tipos principais de porfiria.

O **chumbo** em níveis elevados pode afetar o metabolismo do heme pela sua combinação com grupos SH presentes em enzimas como a ferroquelatase e a ALA-desidratase. Isso altera o metabolismo das porfirinas. São encontrados níveis elevados de protoporfirina nos eritrócitos, e são detectados níveis elevados de ALA e de coproporfirina na urina.

Existe a esperança de que o **tratamento** das porfirias em nível genético se torne possível. Enquanto isso, ele é essencialmente sintomático. É importante que os pacientes **evitem fármacos** que provocam a indução do citocromo P450. A ingestão de grandes quantidades de **carboidratos** (carga de glicose) ou a administração de **hematina** (um hidróxido do heme) podem reprimir a ALA1, resultando em diminuição da produção de precursores tóxicos do heme. Os pacientes que apresentam fotossensibilidade podem beneficiar-se da administração de β-**caroteno**, pois esse composto parece reduzir a produção de radicais livres, diminuindo, assim, a fotossensibilidade. Os **filtros solares** que bloqueiam a luz visível também podem ser úteis para esses pacientes.

O CATABOLISMO DO HEME PRODUZ BILIRRUBINA

Em condições normais, nos seres humanos adultos, cerca de 200 bilhões de eritrócitos são destruídos por dia. Assim, para um ser humano de 70 kg, a renovação diária da **hemoglobina** é de aproximadamente **6 g**. Quando a hemoglobina é destruída no organismo, a **globina** é decomposta em seus aminoácidos constituintes, que são reutilizados, e o **ferro** do heme retorna ao reservatório de ferro, também para ser reaproveitado. A porção **porfirina** desprovida de ferro também é degradada, principalmente nas células reticuloendoteliais do fígado, do baço e da medula óssea.

O **catabolismo do heme** proveniente de todas as proteínas heme o parece ocorrer nas frações microssomais das células por um sistema enzimático complexo, denominado **heme-oxigenase**. Quando o heme derivado das hemoproteínas chega ao sistema da oxigenase, o ferro já está habitualmente oxidado à forma **férrica**, constituindo a **hemina**. O sistema da heme-oxigenase é induzível por substrato. Conforme ilustrado na **Figura 31-12,** a hemina é **reduzida** a heme com NADPH, e, com a ajuda de mais NADPH, o oxigênio é acrescentado à ponte de α-metino entre os anéis pirrólicos I e II da porfirina. O ferro ferroso é **novamente oxidado** em sua forma férrica. Com o acréscimo subsequente de oxigênio, o **ferro férrico** é liberado, ocorre produção de **monóxido de carbono**, e a clivagem do anel tetrapirrólico resulta em uma quantidade equimolar de **biliverdina**.

Nas aves e nos anfíbios, a **biliverdina IX** verde é excretada; nos mamíferos, uma enzima solúvel, denominada **biliverdina-redutase**, reduz a ponte de metino entre os anéis pirrólicos III e IV em um grupo metileno, produzindo a **bilirrubina**, um pigmento amarelo (Figura 31-12).

De acordo com as estimativas, **1 g de hemoglobina** produz **35 mg de bilirrubina**. Nos seres humanos adultos, a formação diária de bilirrubina é de cerca de 250 a 350 mg, derivados principalmente da hemoglobina, mas também da eritropoiese ineficaz e de várias outras hemoproteínas, como o citocromo P450.

A conversão química do heme em bilirrubina pelas células reticuloendoteliais pode ser observada *in vivo* à medida que a cor roxo do heme em um **hematoma** é lentamente convertida no pigmento amarelo da bilirrubina.

A bilirrubina formada nos tecidos periféricos é **transportada até o fígado** pela albumina plasmática. O **metabolismo subsequente** da bilirrubina ocorre principalmente no fígado. Pode ser dividido em três processos: (1) captação da bilirrubina pelas

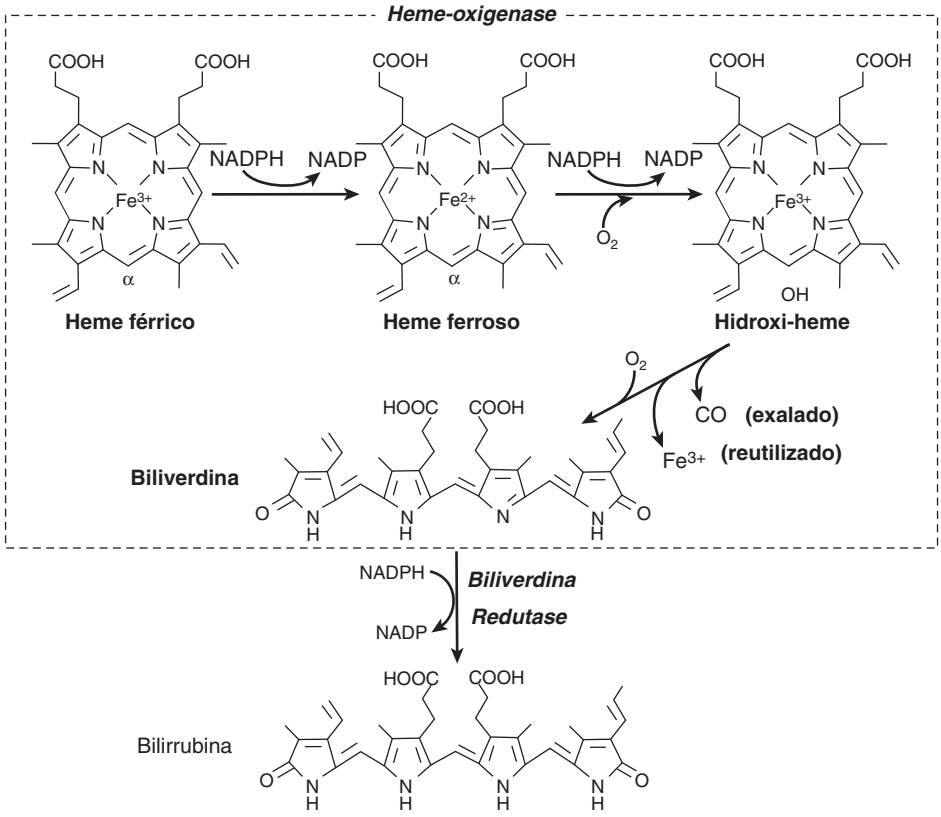


FIGURA 31-12 Representação esquemática do sistema microssomal da heme-oxigenase. A sequência de grupos de cadeia lateral na bilirrubina (da esquerda para a direita) é M, V, M, P, P, M, M, V (M, metil; V, vinil; P, propionil). (Redesenhada, com autorização, de Antony McDonagh, de Schmid R, McDonough AF em: *The Porphyrins*. Dolphin D [ed.]. Academic Press, 1978. Reimpresso com autorização da Elsevier.)

células do parênquima hepático, (2) conjugação da bilirrubina com glicuronato no retículo endoplasmático e (3) secreção da bilirrubina conjugada na bile. Cada um desses processos será analisado separadamente.

O FÍGADO CAPTA BILIRRUBINA

A bilirrubina é apenas **moderadamente hidrossolúvel**, porém a sua solubilidade no plasma aumenta com a sua ligação não covalente à albumina. Cada molécula de albumina parece ter um sítio de alta afinidade e outro de baixa afinidade pela bilirrubina. Em 100 mL de plasma, aproximadamente 25 mg de bilirrubina podem estar firmemente ligados à albumina em seu sítio de alta afinidade. A bilirrubina em quantidades acima desse valor pode ligar-se apenas frouxamente e, assim, pode desprender-se com facilidade e sofrer difusão nos tecidos. Diversos compostos, como os **antibióticos e outros fármacos**, competem com a bilirrubina pelo sítio de ligação de alta afinidade da albumina. Por conseguinte, esses compostos podem deslocar a bilirrubina da albumina, exercendo efeitos clínicos significativos.

No fígado, a bilirrubina é retirada da albumina e captada na superfície sinusoidal dos hepatócitos por um sistema saturável mediado por carreador. Esse **sistema de transporte facilitado** tem uma capacidade muito grande, de modo que, até mesmo em condições patológicas, o sistema não parece constituir uma etapa limitadora de velocidade no metabolismo da bilirrubina.

Como esse sistema de transporte facilitado possibilita o equilíbrio da bilirrubina através da membrana sinusoidal do hepatócito, a captação efetiva de bilirrubina irá depender de sua **remoção** por vias metabólicas subsequentes.

Após entrar nos hepatócitos, a bilirrubina pode **ligar-se a determinadas proteínas do citosol**, que ajudam a mantê-la solubilizada antes da conjugação. A **ligandina** (membro da família das glutationa *S*-transferases) e a **proteína Y** são os compostos envolvidos. Além disso, podem ajudar a impedir o efluxo da bilirrubina de volta à corrente sanguínea.

A conjugação da bilirrubina com ácido glicurônico ocorre no fígado

A bilirrubina é **apolar** e permaneceria nas células (p. ex., ligada a lipídeos) se não fosse convertida em composto hidrossolúvel. Os hepatócitos convertem a bilirrubina em uma forma **polar**, que é prontamente excretada na bile após o acréscimo de moléculas de ácido glicurônico. Esse processo, que é denominado **conjugação**, pode utilizar outras moléculas polares além do ácido glicurônico (p. ex., sulfato). Muitos hormônios esteroides e fármacos também são convertidos em derivados hidrossolúveis por conjugação antes de sua excreção (ver **Capítulo 53**).

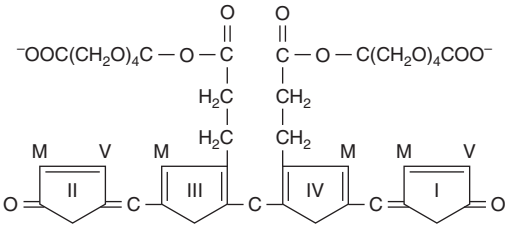


FIGURA 31-13 Estrutura do diglicuronídeo de bilirrubina (bilirrubina conjugada de "reação direta"). O ácido glicurônico é fixado por uma ligação éster aos dois grupos de ácido propiônico da bilirrubina para formar um acilglicuronídeo.

A conjugação da bilirrubina é catalisada por uma **glicuronosiltransferase** específica. Essa enzima está localizada principalmente no retículo endoplasmático, utiliza o UDP-ácido glicurônico como doador de glicuronosil e é designada como bilirrubina UGT. O monoglicuronídeo de bilirrubina é um intermediário, que é subsequentemente convertido em **diglicuronídeo** (**Figuras 31-13** e **31-14**). A maior parte da bilirrubina excretada na bile dos mamíferos encontra-se na forma de diglicuronídeo de bilirrubina. Entretanto, mesmo quando os conjugados de bilirrubina aparecem anormalmente no **plasma humano** (p. ex., na icterícia obstrutiva) consistem predominantemente em **monoglicuronídeos**. A atividade da bilirrubina UGT pode ser **induzida** por diversos fármacos clinicamente eficientes, inclusive o fenobarbital. Mais informações sobre a glicuronosilação são apresentadas adiante, na discussão sobre os distúrbios hereditários da conjugação da bilirrubina.

A bilirrubina é secretada na bile

A **secreção** da bilirrubina conjugada na bile ocorre por um mecanismo de **transporte ativo,** que provavelmente constitui a etapa limitadora de velocidade de todo o processo de metabolismo hepático da bilirrubina. A proteína envolvida é a **MRP-2** (proteína semelhante resistência a múltiplos fármacos 2), também conhecida como transportador multiespecífico de ânions orgânicos (MOAT). Essa proteína está localizada na **membrana plasmática** dos canalículos biliares e efetua o processamento de alguns ânions orgânicos. Trata-se de um membro da família de transportadores cassete de ligação ao ATP. O transporte hepático da bilirrubina conjugada na bile é **induzível** pelos mesmos fármacos capazes de induzir a conjugação da bilirrubina. Desse modo, os sistemas de conjugação e excreção da bilirrubina comportam-se como uma unidade funcional coordenada.

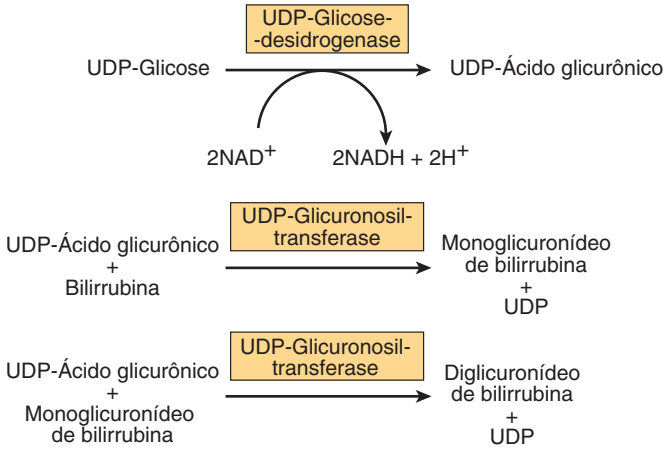


FIGURA 31-14 Conjugação da bilirrubina com ácido glicurônico. O doador de glicuronato, o UDP-ácido glicurônico, é formado a partir da UDP-glicose, conforme ilustrado. A UDP-glicuronisoltransferase é também denominada bilirrubina UGT.

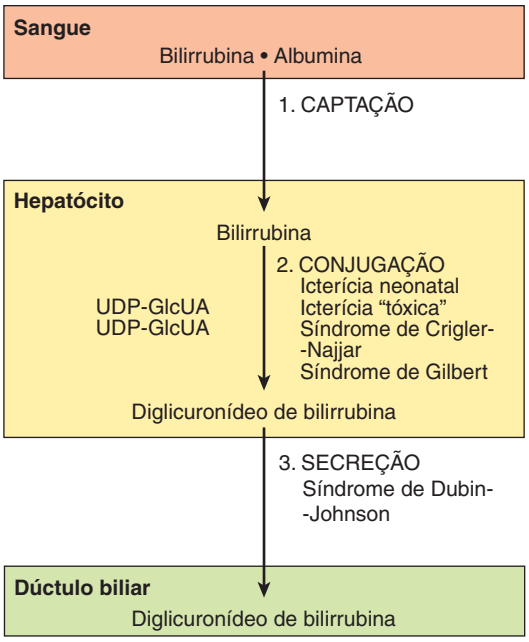


FIGURA 31-15 Representação esquemática dos três principais processos (captação, conjugação e secreção) envolvidos na transferência da bilirrubina do sangue para a bile. Algumas proteínas dos hepatócitos, como a ligandina (membro da família de enzimas da glutationa *S*-transferase) e a proteína Y, ligam-se à bilirrubina intracelular e podem impedir a sua saída para a corrente sanguínea. A figura também mostra o processo afetado em diversas condições que causam icterícia.

A **Figura 31-15** fornece um resumo dos três processos principais envolvidos na **transferência da bilirrubina** do sangue para a bile. A figura também mostra os locais que são afetados em diversas condições que provocam icterícia.

A bilirrubina conjugada é reduzida a urobilinogênio pelas bactérias intestinais

À medida que a bilirrubina conjugada alcança o íleo terminal e o intestino grosso, os glicuronídeos são removidos por enzimas bacterianas específicas (β-**glicuronidases**), e o pigmento é subsequentemente **reduzido** pela flora fecal a um grupo de compostos tetrapirrólicos incolores, denominados **urobilinogênios**. No íleo terminal e no intestino grosso, uma pequena fração dos urobilinogênios é reabsorvida e novamente excretada pelo fígado, constituindo o **ciclo êntero-hepático de urobilinogênio**. Em condições anormais, particularmente quando há formação de pigmento biliar em quantidades excessivas, ou quando a doença

hepática interfere nesse ciclo intra-hepático, o urobilinogênio também pode ser excretado na **urina**.

Em condições normais, a maior parte dos urobilinogênios incolores formados no colo pela flora fecal é **oxidada** a **urobilinas** (compostos incolores) e excretada nas fezes. O escurecimento das fezes com a sua permanência ao ar livre deve-se à oxidação dos urobilinogênios residuais em urobilinas.

A HIPERBILIRRUBINEMIA CAUSA ICTERÍCIA

Quando a concentração de bilirrubina no sangue ultrapassa 1 mg/dL (17,1 μmol/L), ocorre **hiperbilirrubinemia**. A hiperbilirrubinemia pode ser causada pela **produção** de bilirrubina em quantidades maiores do que as que podem ser excretadas pelo fígado normal, ou pode resultar da **incapacidade** do fígado lesionado de **excretar** a bilirrubina produzida em quantidades normais. Na ausência de lesão hepática, a **obstrução** dos ductos excretores do fígado – ao impedir a excreção de bilirrubina – também causa hiperbilirrubinemia. Em todas essas situações, a bilirrubina acumula-se no sangue e, quando alcança determinada concentração (aproximadamente 2 a 2,5 mg/dL), sofre difusão para os tecidos, que tornam-se então amarelados. Essa condição é denominada **icterícia**.

Em estudos clínicos de icterícia, a **determinação da bilirrubina no soro** é de grande valor. Um método de avaliação quantitativa da concentração de bilirrubina no soro foi projetado pela primeira vez por **van den Bergh** pela aplicação do **teste de Ehrlich** para a bilirrubina na urina. A reação de Ehrlich baseia-se no acoplamento do ácido sulfanílico diazotado (reagente diazo de Ehrlich) com a bilirrubina para produzir um composto azo roxo avermelhado. No procedimento original descrito por Ehrlich, o **metanol** era usado para formar uma solução na qual tanto a bilirrubina quanto o reagente diazo fossem solúveis. Acidentalmente, van den Bergh omitiu o metanol quando tentava realizar um ensaio para o pigmento biliar na bile humana. Para a sua surpresa, o aparecimento da coloração normal ocorreu "diretamente". Essa forma de bilirrubina capaz de reagir sem a adição de metanol foi então denominada bilirrubina de "**reação direta**". Em seguida, foi constatado que essa mesma reação direta também poderia ocorrer no soro de pacientes com icterícia causada por obstrução biliar. Entretanto, ainda era necessário adicionar metanol para detectar a bilirrubina no soro normal ou aquela presente em quantidades excessivas no soro de pacientes com icterícia hemolítica, sem qualquer evidência de obstrução. Essa forma de bilirrubina, que só podia ser dosada após a adição de metanol, foi designada como bilirrubina de "**reação indireta**".

Subsequentemente, foi descoberto que a **bilirrubina indireta** é a **bilirrubina** "**livre**" (não conjugada) em seu trajeto para o fígado, proveniente dos tecidos reticuloendoteliais, onde a bilirrubina é originalmente produzida pela degradação das heme porfirinas. Como essa bilirrubina não é hidrossolúvel, é necessário acrescentar metanol para iniciar o seu acoplamento com o reagente diazo. No fígado, a bilirrubina livre é **conjugada** com ácido glicurônico, e o conjugado, predominantemente diglicuronídeo de bilirrubina, pode ser então excretado na bile. Além disso, por ser hidrossolúvel, a bilirrubina conjugada pode reagir diretamente com o reagente diazo, de modo que a "bilirrubina direta" de van den Bergh é, na verdade, um conjugado de bilirrubina (glicuronídeo de bilirrubina).

TABELA 31-3 Algumas causas de hiperbilirrubinemia não conjugada e conjugada

Não conjugada	Conjugada
Anemias hemolíticas	Obstrução da árvore biliar
"Icterícia fisiológica" neonatal	Síndrome de Dubin-Johnson
Síndrome de Crigler-Najjar dos tipos I e II	Síndrome de Rotor
Síndrome de Gilbert	Doenças hepáticas, como os vários tipos de hepatite
Hiperbilirrubinemia tóxica	

Essas causas são discutidas de modo sucinto no texto. As causas comuns de obstrução da árvore biliar consistem em cálculo no ducto colédoco e câncer da cabeça do pâncreas. Várias doenças hepáticas (p. ex., os vários tipos de hepatite) constituem causas frequentes de hiperbilirrubinemia predominantemente conjugada.

Dependendo do tipo de bilirrubina presente no plasma – isto é, livre ou conjugada –, a hiperbilirrubinemia pode ser classificada como **hiperbilirrubinemia de retenção**, devido a uma produção excessiva, ou **hiperbilirrubinemia de regurgitação**, causada por refluxo na corrente sanguínea em decorrência de obstrução biliar.

A separação e a quantificação da bilirrubina não conjugada e da conjugada podem ser efetuadas por meio de **cromatografia líquida** de alta pressão.

Em virtude de sua **hidrofobicidade**, apenas a bilirrubina não conjugada pode atravessar a barreira hematencefálica e alcançar o sistema nervoso central; assim, a encefalopatia causada por hiperbilirrubina (***kernicterus***) só pode ocorrer com bilirrubina não conjugada, conforme observado na hiperbilirrubinemia de retenção. Por outro lado, tendo em vista a sua hidrossolubilidade, apenas a bilirrubina conjugada pode aparecer na urina. Portanto, a **icterícia colúrica** (a colúria refere-se à presença de pigmentos biliares na urina) só ocorre na hiperbilirrubinemia de regurgitação, enquanto a **icterícia acolúrica** só é observada na presença de quantidades excessivas de bilirrubina não conjugada.

A **Tabela 31-3** fornece uma lista de algumas causas de hiperbilirrubinemia não conjugada e conjugada. Esses distúrbios são descritos de modo sucinto nas seções seguintes.

Ocorrem quantidades aumentadas de bilirrubina não conjugada no sangue em diversos distúrbios

Anemias hemolíticas

As **anemias hemolíticas** constituem uma importante causa de hiperbilirrubinemia não conjugada, embora a hiperbilirrubinemia não conjugada seja **habitualmente apenas discreta** (<4 mg/dL; <68,4 μmol/L), mesmo nos casos de hemólise extensa, devido à grande capacidade de processamento da bilirrubina pelo fígado normal.

"Icterícia fisiológica" neonatal

Esse distúrbio **transitório** constitui a causa mais comum de hiperbilirrubinemia não conjugada. Resulta da hemólise acelerada que ocorre em torno da época do **nascimento** e da imaturidade do sistema hepático para a captação, a conjugação e a secreção da bilirrubina. Não apenas há uma redução da atividade da bilirrubina UGT, como também existe a probabilidade de síntese reduzida do substrato para essa enzima, UDP-ácido glicurônico. Como a quantidade aumentada de bilirrubina está não conjugada, ela pode atravessar a barreira hematencefálica quando a sua concentração plasmática ultrapassar aquela que pode ser ligada firmemente à albumina (20 a 25 mg/dL). Isso pode resultar em encefalopatia tóxica hiperbilirrubinêmica ou ***kernicterus***, que pode provocar retardo mental. Tendo em vista a reconhecida natureza induzível desse sistema de metabolismo da bilirrubina, o **fenobarbital** tem sido administrado a recém-nascidos ictéricos, visto que esse fármaco é efetivo nesse distúrbio. Além disso, a exposição à **luz azul** (fototerapia) promove a excreção hepática da bilirrubina não conjugada ao converter parte da bilirrubina em outros derivados, como fragmentos de maleimida e isômeros geométricos, que são excretados na bile.

Síndrome de Crigler-Najjar, tipo I; icterícia não hemolítica congênita

A **síndrome de Crigler-Najjar do tipo I** é um distúrbio autossômico recessivo **raro**. Caracteriza-se por icterícia congênita severa (nível sérico de bilirrubina habitualmente acima de 20 mg/dL), devido a mutações no gene que codifica a atividade da **bilirrubina-UGT** nos tecidos hepáticos. Com frequência, a doença é fatal nos primeiros 15 meses de vida. As crianças com essa doença têm sido tratadas com **fototerapia**, resultando em alguma redução dos níveis plasmáticos de bilirrubina. O fenobarbital não exerce nenhum efeito sobre a formação de glicuronídeos de bilirrubina em pacientes com síndrome de Crigler-Najjar do tipo I. O **transplante de fígado** pode levar à cura.

Convém ressaltar que o gene que codifica a bilirrubina UGT humana faz parte de um grande complexo gênico de UGT, situado no cromossomo 2. Muitos substratos diferentes são submetidos à glicuronosilação; por conseguinte, são necessárias **numerosas glicuronosiltransferases**. O complexo contém alguns dos 13 primeiros éxons específicos de substrato, cada um com seu próprio promotor. Quatro são pseudogenes, de modo que são codificadas nove isoformas diferentes, com diversas atividades de glicuronosiltransferase. O éxon A1 está envolvido com a conjugação da bilirrubina, e, nesse caso, ele é unido ao DNA contendo os éxons 2 a 5, produzindo bilirrubina-UGT. Outras transferases são produzidas por *splicing* de outros éxons iniciais (membros de A 2 a 13) aos éxons 2 a 5.

Síndrome de Crigler-Najjar, tipo II

Esse distúrbio hereditário **raro** também resulta de mutações do gene que codifica a bilirrubina-UGT, porém alguma atividade enzimática é conservada, e o distúrbio tem uma evolução **mais benigna** que a do tipo I. Em geral, as concentrações séricas de bilirrubina não ultrapassam 20 mg/dL. Os pacientes com essa condição podem responder ao tratamento com grandes doses de **fenobarbital**.

Síndrome de Gilbert

Esse distúrbio relativamente prevalente também é causado por mutações do gene que codifica a bilirrubina-UGT. É mais comum entre indivíduos do **sexo masculino**. Cerca de 30% da atividade enzimática são preservados, e o distúrbio é totalmente **inócuo**.

Hiperbilirrubinemia tóxica

A **hiperbilirrubinemia não conjugada** pode resultar de disfunção hepática **induzida por toxinas**, como aquela causada por clorofórmio, arsfenaminas, tetracloreto de carbono, acetaminofeno, vírus da hepatite, cirrose e envenenamento pelo cogumelo *Amanita*. Esses distúrbios adquiridos são decorrentes da lesão das células do parênquima hepático, comprometendo a conjugação.

A obstrução da árvore biliar constitui a causa mais comum de hiperbilirrubinemia conjugada

Obstrução da árvore biliar

Em geral, a **hiperbilirrubinemia conjugada** resulta de obstrução dos ductos hepáticos ou do ducto colédoco, mais frequentemente devido a um cálculo biliar ou a um **câncer** da cabeça do pâncreas (**Figura 31-16**). Devido à obstrução, o diglicuronídeo de bilirrubina não pode ser excretado. Nessas condições, regurgita nas veias e nos linfáticos hepáticos, e a bilirrubina conjugada aparece no sangue e na urina (**icterícia colúrica**). Além disso, as **fezes** têm habitualmente cor pálida e devem ser examinadas rotineiramente em qualquer caso de icterícia.

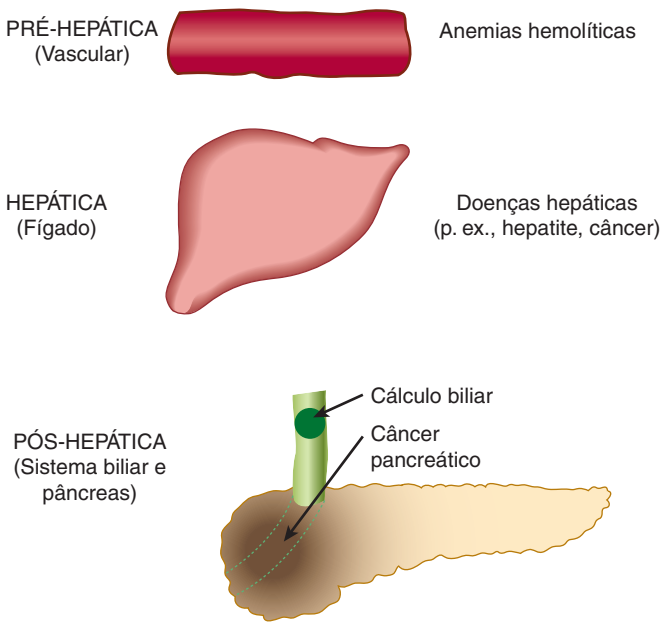


FIGURA 31-16 Representação esquemática de algumas das principais causas de icterícia. Pré-hepática indica eventos na corrente sanguínea; a principal causa consiste nas várias formas de anemia hemolítica (ver Capítulo 52). **Hepática** refere-se a eventos que ocorrem no fígado, como os vários tipos de hepatite ou outras formas de doença hepática (p. ex., câncer). **Pós-hepática** refere-se a eventos observados na árvore biliar; as principais causas de icterícia pós-hepática consistem em obstrução do ducto colédoco por um cálculo biliar ou por câncer da cabeça do pâncreas.

TABELA 31-4 Resultados laboratoriais em indivíduos normais e pacientes com três causas diferentes de icterícia

Condição	Bilirrubina sérica	Urobilinogênio urinário	Bilirrubina urinária	Urobilinogênio fecal
Normal	Direta: 0,1 a 0,4 mg/dL	0 a 4 mg/24 h	Ausente	40 a 280 mg/24 h
	Indireta: 0,2 a 0,7 mg/dL			
Anemia hemolítica	↑ Indireta	Aumentado	Ausente	Aumentado
Hepatite	↑ Direta e indireta	Reduzido se houver micro-obstrução	Presente se houver micro-obstrução	Reduzido
Icterícia obstrutiva[1]	↑ Direta	Ausente	Presente	De traços a ausente

[1]As causas mais comuns de icterícia obstrutiva (pós-hepática) consistem em câncer da cabeça do pâncreas e cálculo alojado no ducto colédoco. A presença de bilirrubina na urina é algumas vezes designada como colúria – assim, a hepatite e a obstrução do ducto colédoco causam icterícia colúrica, enquanto a icterícia da anemia hemolítica é designada como acolúrica. Os resultados laboratoriais em pacientes com hepatite são variáveis, dependendo da extensão da lesão das células parenquimatosas e do grau de micro-obstrução dos dúctulos biliares. Os níveis séricos de **alanina aminotransferase** (ALT) e **aspartato aminotransferase** (AST) estão, em geral, acentuadamente elevados na hepatite, enquanto os níveis séricos de **fosfatase alcalina** estão elevados na doença hepática obstrutiva.

Utiliza-se o termo **icterícia colestática** para incluir todos os casos de icterícia obstrutiva extra-hepática. Esse termo também engloba os casos de icterícia que exibem hiperbilirrubinemia conjugada, devido à micro-obstrução dos dúctulos biliares intra-hepáticos pelos hepatócitos aumentados e lesionados (p. ex., como pode ocorrer na hepatite infecciosa).

Síndrome de Dubin-Johnson

Esse distúrbio autossômico recessivo **benigno** consiste em **hiperbilirrubinemia conjugada** na infância ou na vida adulta. A hiperbilirrubinemia é causada por mutações do gene que codifica a **MRP-2** (ver anteriormente), a proteína envolvida na **secreção** de bilirrubina conjugada na bile. Os hepatócitos centrilobulares contêm um pigmento negro anormal, que pode ser derivado da epinefrina.

Síndrome de Rotor

Esse distúrbio **benigno** raro caracteriza-se por hiperbilirrubinemia conjugada crônica e histologia hepática normal. A sua etiologia precisa ainda não foi definida.

Parte da bilirrubina pode ligar-se de modo covalente à albumina

Quando os níveis plasmáticos de bilirrubina conjugada permanecem elevados, uma fração pode **ligar-se de modo covalente à albumina** (bilirrubina δ [delta]). Como está ligada à albumina de modo covalente, essa fração apresenta **meia-vida mais longa** no plasma do que a bilirrubina conjugada convencional. Por conseguinte, seus níveis permanecem elevados durante a fase de recuperação da icterícia obstrutiva, depois que o restante da bilirrubina conjugada declinou para valores normais; isso explica por que alguns pacientes continuam ictéricos após a normalização dos níveis de bilirrubina conjugada.

O urobilinogênio e a bilirrubina na urina são indicadores clínicos

Normalmente, existem apenas traços de **urobilinogênio** na urina. Na **obstrução completa do ducto biliar**, não há urobilinogênio na urina, visto que a bilirrubina não tem acesso ao intestino, onde poderia ser convertida em urobilinogênio. Nesse caso, a presença de bilirrubina (conjugada) na urina sem urobilinogênio sugere icterícia obstrutiva, seja intra-hepática ou pós-hepática.

Na **icterícia secundária à hemólise**, a produção aumentada de bilirrubina resulta em aumento da produção de **urobilinogênio,** que aparece na urina em grandes quantidades. A bilirrubina não é habitualmente detectada na urina de pacientes com icterícia hemolítica (visto que a bilirrubina não conjugada não passa para a urina), de modo que a **combinação de níveis elevados de urobilinogênio e a ausência de bilirrubina** sugerem icterícia hemolítica. A destruição aumentada no sangue de qualquer etiologia provoca um aumento do urobilinogênio urinário.

A **Tabela 31-4** fornece um resumo dos **resultados laboratoriais** obtidos em pacientes com três causas diferentes de icterícia – **anemia hemolítica** (causa pré-hepática), **hepatite** (causa hepática) e **obstrução do ducto colédoco** (causa pós-hepática) (ver **Figura 31-16**). Os exames laboratoriais em amostras de **sangue** (para avaliar a possibilidade de anemia hemolítica e determinar o tempo de protrombina) ou de **soro** (p. ex., eletroforese das proteínas; atividade das enzimas ALT, AST e fosfatase alcalina) também são importantes para ajudar a diferenciar as causas pré-hepática, hepática e pós-hepática da icterícia.

RESUMO

- As hemoproteínas, como a hemoglobina e os citocromos, contêm heme. O heme é um composto de ferro-porfirina (Fe^{2+}-protoporfirina IX), em que quatro anéis pirrólicos estão ligados por pontes de metino. Os oito grupos laterais (substituintes metil, vinil e propionil) nos quatro anéis pirrólicos do heme estão dispostos em uma sequência específica.
- A biossíntese do anel do heme ocorre nas mitocôndrias e no citosol por meio de oito etapas enzimáticas. O processo começa com a formação do δ-aminolevulinato a partir do succinil-CoA e da glicina, em reação catalisada pela ALA-sintase, a enzima reguladora da via.
- As anormalidades geneticamente determinadas de sete das oito enzimas envolvidas na biossíntese do heme são responsáveis pelas porfirias hereditárias. Os eritrócitos e o fígado

constituem os principais locais de expressão metabólica das porfirias. As queixas comuns consistem em fotossensibilidade e problemas neurológicos. A ingestão de determinados compostos (como o chumbo) pode causar porfirias adquiridas. Quantidades aumentadas de porfirinas ou de seus precursores podem ser detectadas no sangue e na urina, facilitando o estabelecimento do diagnóstico.

- O catabolismo do anel do heme é iniciado pela enzima heme oxigenase, produzindo um tetrapirrol linear.
- A biliverdina é um produto inicial do catabolismo que, com redução, produz bilirrubina. A bilirrubina é transportada pela albumina dos tecidos periféricos até o fígado, onde é captada pelos hepatócitos. O ferro do heme e os aminoácidos da globina são conservados e reutilizados.
- No fígado, a bilirrubina torna-se hidrossolúvel por conjugação com duas moléculas de ácido glicurônico e, a seguir, é secretada na bile. A ação das enzimas bacterianas no intestino produz urobiligênio e urobilina, que são excretados nas fezes e na urina.
- A icterícia é causada pela elevação dos níveis sanguíneos de bilirrubina. As causas da icterícia podem ser classificadas em pré-hepática (p. ex., anemias hemolíticas), hepática (p. ex., hepatite) e pós-hepática (p. ex., obstrução do ducto colédoco). As determinações dos níveis plasmáticos de bilirrubina total e de bilirrubina não conjugada, dos níveis urinários de urobilinogênio e bilirrubina, e de certas enzimas séricas, bem como a inspeção e a análise de amostras fecais, ajudam a diferenciar essas causas.

REFERÊNCIAS

Beckett G, Walker S, Rae T, Ashby P: Liver disease (Chapter 13). In: *Lecture Notes: Clinical Biochemistry*. 8th ed. Wiley-Blackwell, 2010.

Deacon AC, Whatley SD, Elder GH: Porphyrins and disorders of porphyrin metabolism. In: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, 4th ed. Ch. 32. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (editors). Elsevier Saunders, 2006.

Desnick RJ, Astrin KH: The porphyrias. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine,* 17th ed. Fauci AS et al (editors). Ch. 352. McGraw-Hill, 2008.

Dufour DR: Liver disease. In: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, 4th ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (editors). Ch. 47. Elsevier Saunders, 2006.

Higgins T, Beutler E, Doumas BT: Hemoglobin, iron and bilirubin. In: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, 4th ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (editors). Ch. 31. Elsevier Saunders, 2006.

Pratt DS, Kaplan MM: Evaluation of liver function. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th ed. Fauci AS et al (editors). Ch. 296. McGraw-Hill, 2008.

Pratt DS, Kaplan MM: Jaundice. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th ed. Fauci AS et al (editors). Ch. 43. McGraw-Hill, 2008.

Wolkoff AW: Th e hyperbilirubinemias. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th ed. Fauci AS et al (editors). Ch. 297. McGraw-Hill, 2008.

Questões para Estudo

Seção III

1. Selecionar a afirmação que NÃO É CORRETA.
   A. A selenocisteína está presente nos sítios ativos de certas enzimas humanas.
   B. A selenocisteína é inserida em proteínas por um processo pós-tradução.
   C. A transaminação dos α-cetoácidos da dieta pode substituir os aminoácidos essenciais da dieta – leucina, isoleucina e valina.
   D. A conversão da peptidil prolina em peptidil 4-hidroxiprolina é acompanhada da incorporação de oxigênio no succinato.
   E. A serina e a glicina são interconvertidas em uma única reação na qual participam derivados do tetra-hidrofolato.

2. Selecionar a afirmação que NÃO É CORRETA.
   A. O Δ^1-Pirrolina-5-carboxilato é um intermediário tanto na biossíntese quanto no catabolismo da L-prolina.
   B. Os tecidos humanos podem formar aminoácidos nutricionalmente não essenciais a partir de intermediários anfibólicos ou a partir de aminoácidos nutricionalmente essenciais.
   C. Nos seres humanos, o tecido hepático pode formar a serina a partir do intermediário glicolítico, o 3-fosfoglicerato.
   D. A reação catalisada pela fenilalanina-hidroxilase faz a interconversão entre a fenilalanina e a tirosina.
   E. O poder redutor da tetra-hidrobiopterina deriva, em última análise, do NADPH.

3. Identificar o metabólito que NÃO serve como precursor de um aminoácido nutricionalmente essencial:
   A. α-Cetoglutarato
   B. 3-Fosfoglicerato
   C. Glutamato
   D. Aspartato
   E. Histamina

4. Selecionar a resposta CORRETA. A primeira reação na degradação da maior parte dos aminoácidos comuns envolve a participação de:
   A. NAD^+
   B. Piridoxal-fosfato
   C. Tiamina-pirofosfato (TPP)
   D. FAD
   E. NAD^+ e TPP

5. Identificar o aminoácido que é o principal contribuinte na gliconeogênese hepática.
   A. Alanina
   B. Glutamina
   C. Glicina
   D. Lisina
   E. Ornitina

6. Selecionar a afirmação que NÃO É CORRETA.
   A. A taxa de gliconeogênese hepática a partir da glutamina é muito maior que a de qualquer outro aminoácido.
   B. A síndrome de Angelman está associada a um defeito da ubiquitina-E3-ligase.
   C. Após uma refeição rica em proteína, os tecidos esplâncnicos liberam predominantemente aminoácidos de cadeia ramificada, que são captados pelo tecido muscular periférico.
   D. A conversão de um α-aminoácido em seu α-cetoácido correspondente, em uma reação catalisada pela L-α-amino--oxidase, é acompanhada da liberação de NH_4^+.
   E. Sinais e sintomas semelhantes ou até mesmo idênticos podem estar associados a diferentes mutações do gene que codifica uma determinada enzima.

7. Selecionar a afirmação que NÃO É CORRETA.
   A. As sequências de PEST marcam algumas proteínas para sofrer rápida degradação.
   B. Geralmente, o ATP e a ubiquitina participam da degradação das proteínas associadas à membrana e das proteínas com meias-vidas longas.
   C. As moléculas de ubiquitina estão ligadas a proteínas-alvo por ligações não α-peptídicas.
   D. Os descobridores da degradação de proteína mediada pela ubiquitina receberam o Prêmio Nobel.
   E. A degradação das proteínas marcadas com ubiquitina ocorre no proteassomo, uma macromolécula de múltiplas subunidades presente em todos os eucariotos.

8. Nos distúrbios metabólicos do ciclo da ureia, qual a afirmação que NÃO É CORRETA?
   A. A intoxicação por amônia é mais severa quando o bloqueio metabólico ocorre antes da reação 3 do ciclo da ureia, catalisada pela argininossuccinato-sintase.
   B. Os sintomas clínicos consistem em retardo mental e na evitação de alimentos ricos em proteína.
   C. Os sinais clínicos incluem hiperamonemia e acidose respiratória.
   D. O aspartato fornece o segundo nitrogênio do argininossuccinato.
   E. O tratamento dietético consiste em uma dieta hipoproteica com pequenas refeições frequentes.

9. Selecionar a afirmação que NÃO É CORRETA.
   A. Uma função metabólica da glutamina consiste em sequestrar o nitrogênio em uma forma atóxica.
   B. A glutamato-desidrogenase hepática é alostericamente inibida pelo ATP e ativada pelo ADP.
   C. A ureia é formada a partir da amônia absorvida, produzida pelas bactérias entéricas, e a partir da amônia gerada pela atividade metabólica dos tecidos.

D. A ação combinada da glutamato desidrogenase e da glutamato aminotransferase pode ser denominada transdesaminação.
E. O fumarato gerado durante a biossíntese do argininossuccinato forma, em última análise, oxalacetato em reações catalisadas pela furamase mitocondrial e pela malato desidrogenase.

10. Selecionar a afirmação que NÃO É CORRETA.
A. A histamina origina-se da descarboxilação da histidina.
B. A treonina fornece o grupamento tioetanol para a biossíntese de coenzima A.
C. A ornitina atua como precursor da espermina e da espermidina.
D. A serotonina e a melatonina são metabólitos do triptofano.
E. A glicina, a arginina e a metionina contribuem, cada uma delas, com átomos na biossíntese da creatina.

11. Selecionar a afirmação que NÃO É CORRETA.
A. A creatinina excretada é uma função da massa muscular e pode ser usada para determinar se um paciente forneceu uma amostra de urina completa de 24 horas.
B. Muitos fármacos e seus catabólitos são excretados na urina como conjugados de glicina.
C. A descarboxilação da glutamina forma o neurotransmissor inibitório GABA (γ-aminobutirato).
D. A concentração de histamina no hipotálamo exibe um ritmo circadiano.
E. O principal destino metabólico não proteico da metionina é a sua conversão em *S*-adenosilmetionina.

12. Qual das seguintes opções NÃO é uma hemoproteína?
A. Mioglobina
B. Citocromo *c*
C. Catalase
D. Citocromo P450
E. Albumina

13. Um homem de 30 anos de idade chegou a uma clínica com história de dor abdominal intermitente, episódios de confusão e problemas psiquiátricos. Os exames laboratoriais revelaram aumento dos níveis urinários de δ-aminolevulinato e porfobilinogênio. A análise mutacional revelou uma mutação no gene da uroporfirinogênio-I-sintase (porfobilinogênio-desaminase). O diagnóstico provável é de:
A. Anemia sideroblástica ligada ao X.
B. Porfiria intermitente aguda.
C. Porfiria eritropoiética congênita.
D. Porfiria cutânea tardia.
E. Porfiria variegata.

14. Selecionar a afirmação que NÃO É CORRETA.
A. A bilirrubina é um tetrapirrol cíclico.
B. A bilirrubina é transportada no plasma até o fígado ligada à albumina.
C. A bilirrubina em níveis elevados pode causar lesão do cérebro de recém-nascidos.
D. A bilirrubina contém grupos metil e vinil.
E. A bilirrubina não contém ferro.

15. Uma mulher de 62 anos de idade chegou a uma clínica com icterícia intensa, que aumentou continuamente durante os 3 meses precedentes. A paciente forneceu uma história de dor intensa na parte superior do abdome, irradiando-se para as costas, além de perda considerável de peso. Observou que as fezes estiveram muito pálidas por algum tempo. Os exames laboratoriais revelaram nível muito elevado de bilirrubina direta, bem como elevação da bilirrubina urinária. O nível plasmático de alanina aminotransferase (ALT) estava apenas discretamente elevado, enquanto o nível de fosfatase alcalina estava acentuadamente elevado. A ultrassonografia do abdome não revelou qualquer evidência de cálculos biliares. Com base nesses dados, qual o diagnóstico mais provável?
A. Síndrome de Gilbert.
B. Anemia hemolítica.
C. Síndrome de Criggler-Najjar tipo 1.
D. Carcinoma de pâncreas.
E. Hepatite infecciosa.

SEÇÃO

IV

Estrutura, Função e Replicação das Macromoléculas Informativas

CAPÍTULO

32

Nucleotídeos

Victor W. Rodwell, Ph.D.

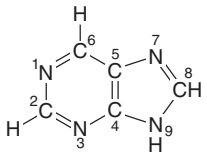
OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Escrever as fórmulas estruturais para representar os amino- e oxotautômeros de uma purina e de uma pirimidina e especificar qual o tautômero que predomina em condições fisiológicas.
- Reproduzir as fórmulas estruturais dos principais nucleotídeos presentes no DNA e no RNA e nos nucleotídeos menos comuns: a 5-metilcitosina, a 5-hidroximetilcitosina e a pseudouridina (ψ).
- Representar a D-ribose ou a 2-desoxi-D-ribose ligadas com conformação *sin* e *anti* de uma purina, citar a ligação entre o açúcar e a base e indicar qual a conformação que predomina na maioria das condições fisiológicas.
- Numerar os átomos de C e N de um nucleotídeo pirimidínico e de um nucleosídeo purínico, incluindo o uso de um número primo para os átomos de C e N dos açúcares.
- Comparar o potencial de transferência do grupo fosforila de cada grupo fosforila de um nucleosídeo trifosfato.
- Descrever em linhas gerais as funções fisiológicas dos fosfodiésteres cíclicos AMPc e GMPc.
- Reconhecer que os polinucleotídeos são macromoléculas direcionais, compostas de mononucleotídeos ligados por ligações fosfodiéster 3′ → 5′.
- Compreender que, nas representações abreviadas das estruturas polinucleotídicas, como pTpGpT ou TGCATCA, a extremidade 5′ está sempre indicada à esquerda, e todas as ligações fosfodiéster são 3′ → 5′.
- Indicar os mecanismos pelos quais os análogos sintéticos específicos de bases purínicas e pirimidínicas e seus derivados que atuam como agentes antineoplásicos inibem o metabolismo.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Além de atuar como precursores de ácidos nucleicos, os nucleotídeos purínicos e pirimidínicos atuam em funções metabólicas tão diversas quanto o metabolismo energético, a síntese de proteínas, a regulação da atividade enzimática e a transdução de sinais. Quando ligados a vitaminas ou seus derivados, os nucleotídeos constituem uma porção de muitas coenzimas. Como principais doadores e aceptores de grupos fosforila no metabolismo, os nucleosídeos tri e difosfatos, como o ATP e o ADP, desempenham o principal papel na transdução de energia que acompanha as interconversões metabólicas e a fosforilação oxidativa. Os nucleosídeos, ligados a açúcares ou a lipídeos, constituem intermediários essenciais de biossíntese. Os derivados de açúcar, UDP-glicose e UDP-galactose, participam nas interconversões de açúcares, bem como na biossíntese de amido e glicogênio. De modo semelhan-



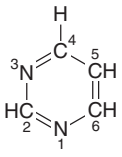


FIGURA 32-1 Purina e pirimidina. Os átomos são numerados de acordo com o sistema internacional.

FIGURA 32-2 Tautomerismo dos grupos funcionais oxo e amino das purinas e pirimidinas.

te, os derivados de nucleosídeo-lipídeo, como o CDP-acilglicerol, são intermediários na biossíntese de lipídeos. Os papéis desempenhados pelos nucleotídeos na regulação metabólica incluem a fosforilação dependente de ATP de enzimas metabólicas essenciais, a regulação alostérica de enzimas pelo ATP, ADP, AMP e CTP e o controle da taxa de fosforilação oxidativa pelo ADP. Os nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc atuam como segundos mensageiros em eventos regulados por hormônios, e tanto o GTP quanto o GDP desempenham papéis fundamentais na cascata de eventos que caracterizam as vias de transdução de sinais. As aplicações médicas incluem o uso de análogos sintéticos das purinas e das pirimidinas que contêm halogênios, tióis ou átomos adicionais de nitrogênio na quimioterapia do câncer e da Aids, e como supressores da resposta imune durante o transplante de órgãos.

QUÍMICA DAS PURINAS, PIRIMIDINAS, NUCLEOSÍDEOS E NUCLEOTÍDEOS

As purinas e as pirimidinas são compostos heterocíclicos

As purinas e as pirimidinas são estruturas cíclicas **heterocíclicas** contendo nitrogênio que apresentam, além dos átomos de carbono, outros átomos (heteroátomos), como o nitrogênio. Observe que a molécula menor de pirimidina é a que tem o nome *maior*, enquanto a molécula maior de purina tem o nome *menor*, com os anéis de seis átomos numerados em sentidos opostos (**Figura 32-1**). As purinas ou as pirimidinas com um grupo $-NH_2$ são bases fracas (valores de pK_a de 3 a 4), embora o próton presente em pH baixo esteja associado, não ao grupo amino exocíclico como seria de esperar, mas a um nitrogênio do anel, geralmente N1 da adenina, N7 da guanina e N3 da citosina. A estrutura planar das purinas e das pirimidinas facilita a sua estreita associação ou "empilhamento", o que estabiliza o DNA de fita dupla (ver Capítulo 34). Os grupos oxo e amino das purinas e das pirimidinas exibem **tautomerismo** cetoenol e amino-imina (**Figura 32-2**), porém as condições fisiológicas favorecem fortemente as formas amino e oxo.

Os nucleosídeos são *N*-glicosídeos

Os nucleo**sídeos** são derivados das purinas e das pirimidinas com um açúcar ligado a um nitrogênio do anel de uma purina ou pirimidina. Os números com apóstrofo (p. ex., 2′ ou 3′) distinguem os átomos de açúcar dos átomos do heterociclo. O açúcar nos **ribonucleosídeos** é a D-ribose, enquanto o dos **desoxirribonucleosídeos** é a 2-desoxi-D-ribose. Ambos os açúcares estão ligados ao heterociclo por uma **ligação β-*N*-glicosídica,** quase sempre no *N*-1 de uma pirimidina ou no *N*-9 de uma purina (**Figura 32-3**).

Os nucleotídeos são nucleosídeos fosforilados

Os mononucleo**tídeos** são nucleo**sídeos** com um grupo fosforila esterificado a um grupo hidroxila do açúcar. Os nucleotídeos 3′ e 5′ são nucleosídeos com um grupo fosforila no grupo hidroxila 3′ ou 5′ do açúcar, respectivamente. Como os nucleotídeos são, em sua maioria, 5′, o prefixo "5′" é geralmente omitido em sua denominação. Por conseguinte, o UMP e o dAMP representam nucleotídeos com um grupo fosforila no C-5 da pentose. Outros grupos fosforila, ligados por **ligações de anidrido ácido** ao grupo fosforila de um mononucleotídeo, formam os **nucleosídeos difosfatos** e **trifosfatos** (**Figura 32-4**).

Os *N*-glicosídeos heterocíclicos existem na conformação *sin* e *anti*

O impedimento estérico proporcionado pela base heterocíclica não permite a liberdade de rotação em torno da ligação β-*N*-glicosídica dos nucleosídeos ou nucleotídeos. Logo, ambos ocorrem

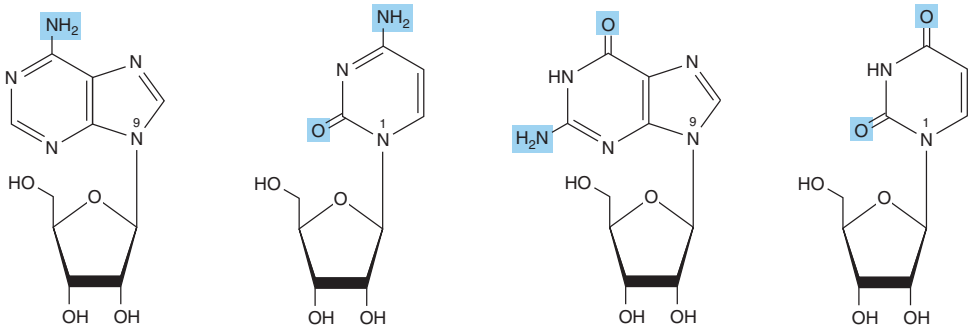


FIGURA 32-3 Ribonucleosídeos apresentados em sua conformação *sin*.

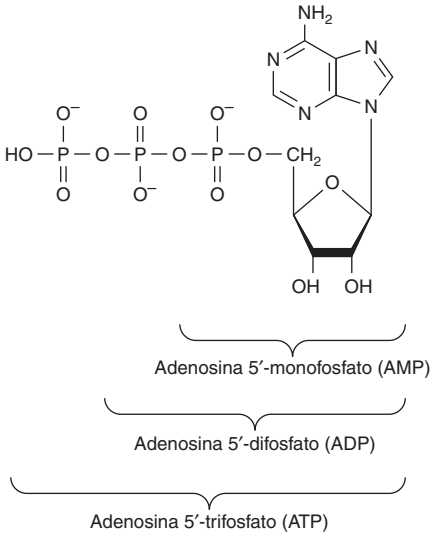


FIGURA 32-4 ATP, seu difosfato e monofosfato.

nas **conformações *sin* ou *anti*** não interconversíveis (**Figura 32-5**). Diferentemente dos tautômeros, as conformações *sin* e *anti* só podem ser interconvertidas por clivagem e por nova formação da ligação glicosídica. Ambas as conformações *sin* e *anti* ocorrem na natureza, porém com predomínio da conformação *anti*.

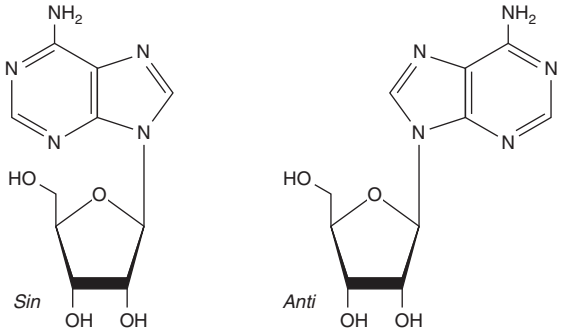
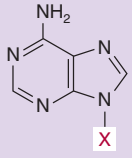
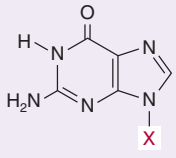
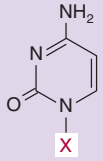
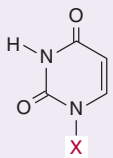
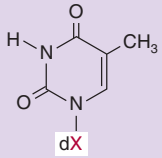


FIGURA 32-5 As conformações *sin* e *anti* da adenosina diferem quanto à sua orientação ao redor da ligação *N*-glicosídica.

A **Tabela 32-1** fornece uma lista das principais purinas e pirimidinas e seus nucleosídeos e nucleotídeos derivados. São utilizadas abreviaturas de uma letra para identificar a adenina (A), a guanina (G), a citosina (C), a timina (T) e a uracila (U), estejam em sua forma livre ou presentes em nucleosídeos ou nucleotídeos. O prefixo "d" (desoxi) indica que o açúcar é a 2′-desoxi-D-ribose (p. ex., no dATP) (**Figura 32-6**).

TABELA 32-1 Bases purínicas, ribonucleosídeos e ribonucleotídeos

Purina ou pirimidina	X = H	X = Ribose	X = Ribose fosfato
	Adenina	Adenosina	Adenosina monofosfato (AMP)
	Guanina	Guanosina	Guanosina monofosfato (GMP)
	Citosina	Citidina	Citidina monofosfato (CMP)
	Uracila	Uridina	Uridina monofosfato (UMP)
	Timina	Timidina	Timidina monofosfato (TMP)

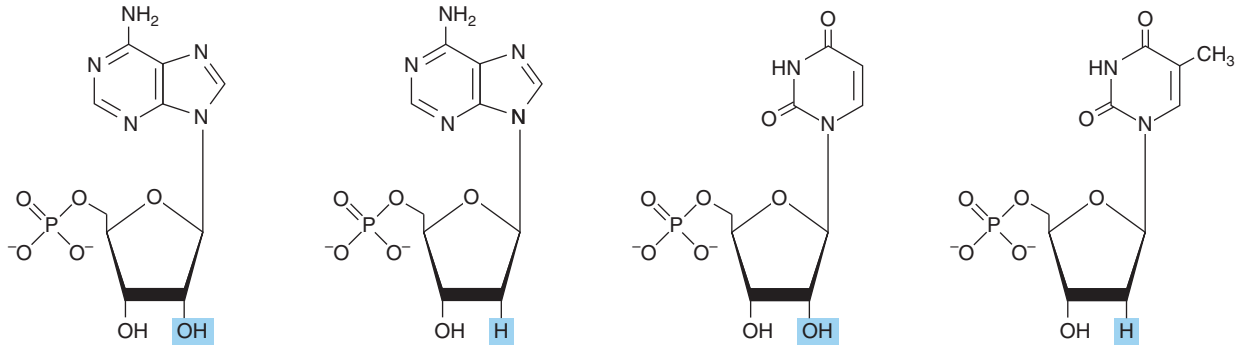


FIGURA 32-6 Estruturas do AMP, dAMP, UMP e TMP.

A modificação de polinucleotídeos pode gerar estruturas adicionais

Ocorrem pequenas quantidades de purinas e pirimidinas adicionais no DNA e nos RNA. Entre os exemplos, destacam-se a 5-metilcitosina do DNA bacteriano e humano, a 5-hidroximetilcitosina dos ácidos nucleicos bacterianos e virais e as adenina e guanina di-*N*-metiladas dos RNA mensageiros de mamíferos (**Figura 32-7**), que atuam no reconhecimento de oligonucleotídeos e na regulação das meias-vidas dos RNA. Os nucleotídeos livres incluem a hipoxantina, a xantina e o ácido úrico (**Figura 32-8**), que são intermediários no catabolismo da adenina e da guanina (ver Capítulo 33). Os heterociclos metilados de vegetais incluem os derivados da xantina, a cafeína do café, a teofilina do chá e a teobromina do cacau (**Figura 32-9**).

Os nucleotídeos são ácidos polifuncionais

Os grupos fosforila primários e secundários dos nucleosídeos apresentam valores de pK_a de cerca de 1,0 e 6,2, respectivamente. Por conseguinte, os nucleotídeos apresentam uma carga negativa significativa em pH fisiológico. Os valores de pK_a dos grupos fosforila secundários são tais que eles podem atuar tanto como doadores quanto como aceptores de prótons em valores de pH de aproximadamente duas ou mais unidades acima ou abaixo da neutralidade.

Os nucleotídeos absorvem luz ultravioleta

As duplas ligações conjugadas dos derivados purínicos e pirimidínicos absorvem luz ultravioleta. Embora os espectros sejam dependentes do pH, no pH 7,0 todos os nucleotídeos comuns absorvem luz em um comprimento de onda próximo a 260 nm. Desse modo, a concentração de nucleotídeos e de ácidos nucleicos é frequentemente expressa em termos de "absorbância a 260 nm." O efeito mutagênico da luz ultravioleta deve-se à sua absorção por nucleotídeos no DNA, resultando em modificações químicas (ver Capítulo 35).

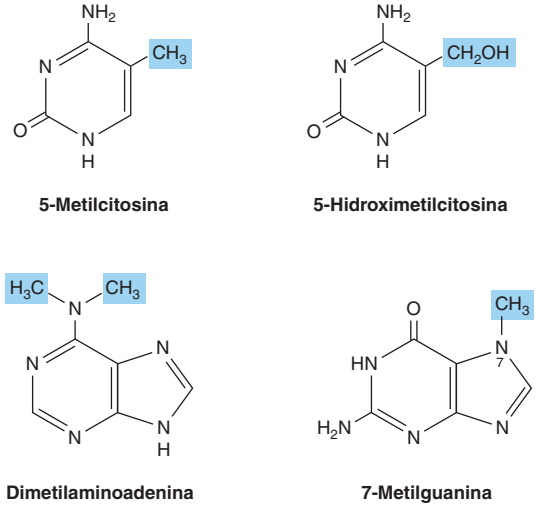


FIGURA 32-7 Quatro pirimidinas e purinas incomuns de ocorrência natural.

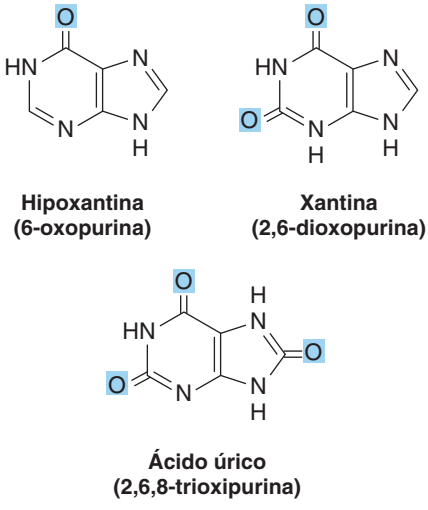


FIGURA 32-8 Estruturas da hipoxantina, da xantina e do ácido úrico mostradas como tautômeros oxo.

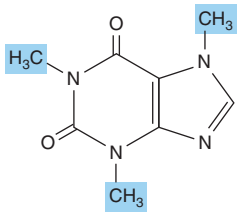


FIGURA 32-9 Cafeína, uma trimetilxantina. As dimetilxantinas teobromina e teofilina são semelhantes, mas carecem do grupo metila em *N*-1 e *N*-7, respectivamente.

Os nucleotídeos desempenham diversas funções fisiológicas

Além de seus papéis como precursores dos ácidos nucleicos, o ATP, o GTP, o UTP, o CTP e seus derivados desempenham, cada um deles, funções fisiológicas específicas discutidas em outros capítulos. Entre os exemplos, destacam-se o papel do ATP como principal transdutor biológico de energia livre, e o segundo mensageiro AMPc (**Figura 32-10**). A concentração intracelular média de ATP, que é o nucleotídeo livre mais abundante nas células de mamíferos, é de cerca de 1 mmol/L. Uma vez que existe pouca necessidade de AMPc, a concentração intracelular de AMPc (cerca de 1 nmol/L) é seis ordens de magnitude abaixo da concentração de ATP. Outros exemplos incluem o adenosina-3′-fosfato-5′-fosfossulfato (**Figura 32-11**), o doador de sulfato para os proteoglicanos sulfatados (ver Capítulo 48) e para os conjugados sulfato de fármacos; e o doador de grupo metila, a *S*-adenosilmetionina (**Figura 32-12**). O GTP funciona como regulador alostérico e como fonte de energia para a síntese de proteínas, enquanto o GMPc (Figura 32-10) atua como segundo mensageiro em resposta ao óxido nítrico (NO) durante o relaxamento do músculo liso (ver Capítulo 49).

Os derivados de UDP-açúcar participam nas epimerizações dos açúcares e na biossíntese de glicogênio (ver Capítulo 19), glicosil dissacarídeos e oligossacarídeos das glicoproteínas e dos proteoglicanos (ver Capítulos 47 e 48). O UDP-ácido glicurônico forma os conjugados de glicuronídeo urinário da bilirrubina (ver Capítulo 31) e de muitos fármacos, incluindo o ácido acetilsalicílico. O CTP participa na biossíntese de fosfoglicerídeos, esfingomielina e outras esfingosinas substituídas (ver Capítulo 24). Por

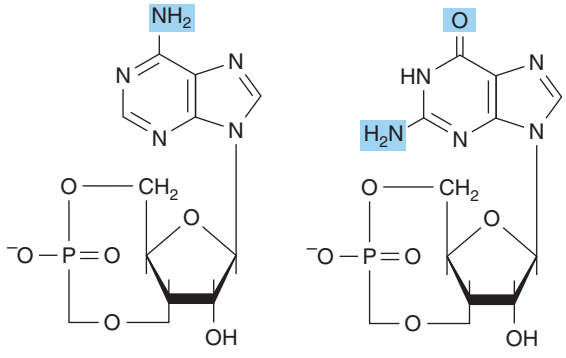


FIGURA 32-10 AMPc, 3′,5′-AMP cíclico e GMPc, 3′,5′-GMP cíclico.

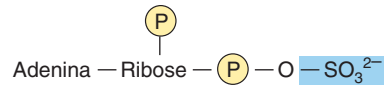


FIGURA 32-11 Adenosina-3′-fosfato-5′-fosfossulfato.

fim, muitas coenzimas também incorporam nucleotídeos, bem como estruturas semelhantes aos nucleotídeos purínicos e pirimidínicos (ver **Tabela 32-2**).

Os nucleosídeos trifosfatos exibem alto potencial de transferência de grupos

Os nucleotídeos trifosfatos têm duas ligações anidrido ácido e uma ligação éster. Diferentemente dos ésteres, os anidridos ácidos exibem alto potencial de transferência de grupos. O valor de $G^{0\prime}$ para a hidrólise de cada um dos dois grupos fosforila (β e γ) terminais de um nucleosídeo trifosfato é de cerca de –7 kcal/mol (–30 kJ/mol). Esse alto potencial de transferência de grupos não apenas permite que os nucleosídeos trifosfatos de purina e pirimidina funcionem como reagentes de transferência de grupos, mais comumente do grupo γ-fosforila, mas também, em certas ocasiões, permite a transferência de um nucleotídeo monofosfato, com liberação concomitante de PP_i. Geralmente, a clivagem de uma ligação de anidrido ácido está acoplada a um processo altamente endergônico, como a síntese de ligações covalentes, por exemplo, a polimerização de nucleosídeos trifosfatos para formar um ácido nucleico (ver Capítulo 34).

OS ANÁLOGOS SINTÉTICOS DE NUCLEOTÍDEOS SÃO UTILIZADOS EM QUIMIOTERAPIA

Os análogos sintéticos das purinas, das pirimidinas, dos nucleosídeos e dos nucleotídeos modificados no anel heterocíclico ou na fração de açúcar apresentam numerosas aplicações na medicina clínica. Seus efeitos tóxicos refletem a inibição de enzimas essen-

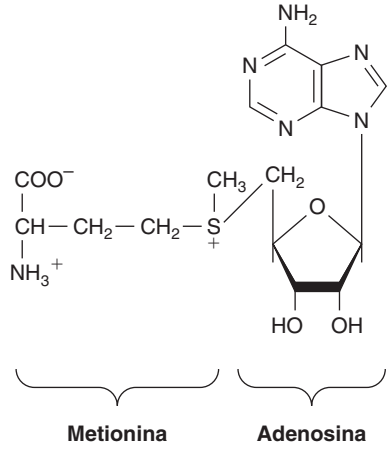
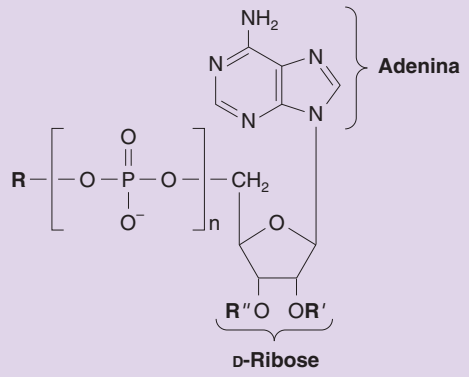


FIGURA 32-12 *S*-Adenosilmetionina.

TABELA 32-2 Muitas coenzimas e compostos relacionados são derivados da adenosina monofosfato



Coenzima	R	R′	R″	n
Metionina ativa	Metionina[1]	H	H	0
Adenilatos de aminoácidos	Aminoácido	H	H	1
Sulfato ativo	SO_3^{2-}	H	PO_3^{2-}	1
3′,5′-AMP cíclico		H	PO_3^{2-}	1
NAD[2]	Nicotinamida	H	H	2
NADP[2]	Nicotinamida	PO_3^{2-}	H	2
FAD	Riboflavina	H	H	2
Coenzima A	Pantotenato	H	PO_3^{2-}	2

[1]Substitui o grupo fosforila.
[2]R é um derivado da vitamina B.

ciais para a síntese dos ácidos nucleicos ou a sua incorporação em ácidos nucleicos, com consequente ruptura do pareamento de bases. Os oncologistas empregam a 5-fluoro ou 5-iodouracila, a 3-desoxiuridina, a 6-tioguanina e 6-mercaptopurina, a 5 ou 6-azauridina, a 5 ou 6-azacitidina e a 8-azaguanina (**Figura 32-13**), que são incorporadas ao DNA antes da divisão celular. O alopurinol, análogo purínico utilizado no tratamento da hiperuricemia e da gota, inibe a biossíntese de purinas e a atividade da xantina-oxidase. A citarabina é utilizada na terapia do câncer, enquanto a azatioprina, que é catabolizada a 6-mercaptopurina, é empregada durante o transplante de órgãos para suprimir a rejeição imunológica (**Figura 32-14**).

Os análogos não hidrolisáveis de nucleosídeos trifosfatos são usados como instrumentos de pesquisa

Os análogos sintéticos não hidrolisáveis de nucleosídeos trifosfatos (**Figura 32-15**) permitem aos pesquisadores diferenciar os efeitos dos nucleotídeos atribuídos à transferência de fosforila dos efeitos mediados pela ocupação de sítios de ligação de nucleotídeos alostéricos das enzimas reguladas.

O DNA E O RNA SÃO POLINUCLEOTÍDEOS

O grupo 5′-fosforila de um mononucleotídeo pode esterificar um segundo grupo hidroxila, formando um **fosfodiéster**. Mais comumente, esse segundo grupo hidroxila é a 3′-OH da pentose de um segundo nucleotídeo. Isso forma um **dinucleotídeo**, em

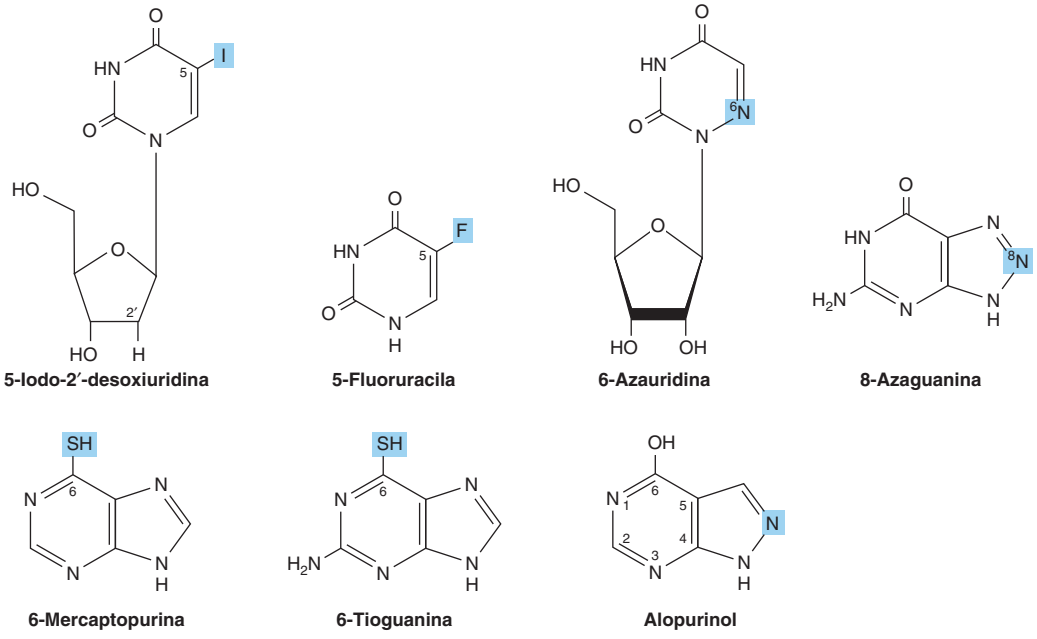
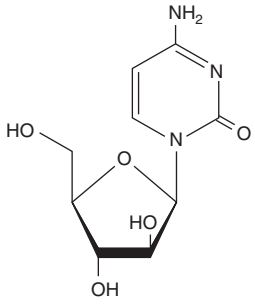
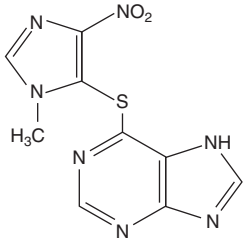


FIGURA 32-13 Análogos sintéticos selecionados das pirimidinas e purinas.

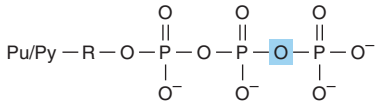


Citarabina

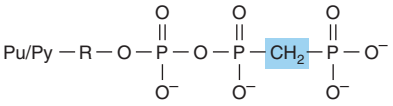


Azatioprina

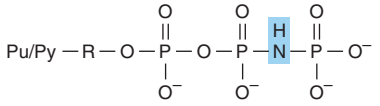
FIGURA 32-14 Arabinosilcitosina (citarabina) e azatioprina.



Nucleosídeo trifosfato precursor



Derivado-β,γ-metileno



Derivado-β,γ-imino

FIGURA 32-15 Derivados sintéticos de nucleosídeos trifosfatos incapazes de sofrer liberação hidrolítica do grupo fosforila terminal. (Pu/Py, uma base purínica ou pirimidínica; R, ribose ou desoxirribose.) A figura mostra o nucleosídeo trifosfato precursor (hidrolisável) (na parte superior) e os derivados β-metileno (*no centro*) e γ-imino (*embaixo*) não hidrolisáveis.

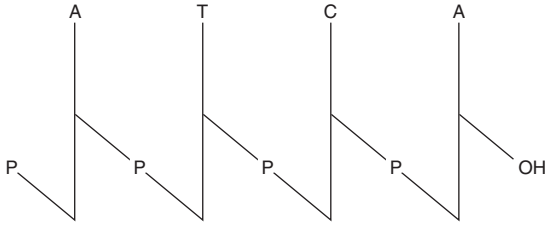
que as frações de pentose estão ligadas por uma ligação fosfodiéster 3′,5′ para formar o "esqueleto" do RNA e do DNA. A formação de um dinucleotídeo pode ser representada como a eliminação de água entre dois mononucleotídeos. Entretanto, não ocorre formação biológica de dinucleotídeos dessa maneira, visto que a reação inversa, isto é, a hidrólise da ligação fosfodiéster, é fortemente favorecida em termos termodinâmicos. Todavia, apesar de um ΔG extremamente favorável, na ausência de catálise pelas **fosfodiesterases**, a hidrólise das ligações fosfodiéster do DNA só ocorre após longos períodos de tempo. Assim, o DNA persiste por períodos consideráveis, e a sua presença foi detectada até mesmo em fósseis. Os RNA são muito menos estáveis do que o DNA, já que o grupo 2′-hidroxila do RNA (ausente no DNA) funciona como nucleófilo durante a hidrólise da ligação 3′,5′-fosfodiéster.

A modificação pós-tradução de **polinucleotídeos** pré-formados pode gerar estruturas adicionais, como a **pseudouridina**, um nucleosídeo em que a D-ribose está ligada ao C-5 da uracila por uma ligação carbono-carbono, em vez da ligação β-*N*-glicosídica habitual. O nucleotídeo ácido pseudouridílico (ψ) surge do rearranjo de um UMP de tRNA pré-formado. De modo semelhante, a metilação da *S*-adenosilmetionina de um UMP de tRNA pré-formado produz TMP (timidina monofosfato), que contém ribose em lugar de desoxirribose.

Os polinucleotídeos são macromoléculas direcionais

As ligações fosfodiéster ligam os carbonos 3′ e 5′ de monômeros adjacentes. Por isso, cada extremidade de um polímero de nucleotídeos é distinta. Assim, as extremidades são mencionadas como a "extremidade 5′" ou a "extremidade 3′" de um polinucleotídeo, sendo a extremidade 5′ a que possui um grupo 5′-hidroxila livre ou fosforilado.

A sequência de bases ou **estrutura primária** de um polinucleotídeo pode ser representada da seguinte maneira. A ligação fosfodiéster é indicada por P ou p, as bases, por uma única letra, e as pentoses, por uma linha vertical.



Quando todas as ligações fosfodiéster são 3′ → 5′, é possível fazer uma notação mais compacta:

pGpGpApTpCpA

Esta representação indica que o grupo 5′-hidroxila – mas não o grupo 3′-hidroxila – está fosforilado. A representação mais compacta, por exemplo, GGATC, mostra apenas a sequência de bases, com a extremidade 5′ à esquerda e a extremidade 3′ à direita. Os grupos fosforila estão supostamente presentes, mas não estão indicados.

RESUMO

- Em condições fisiológicas, predominam os tautômeros amino e oxo das purinas, das pirimidinas e de seus derivados.
- Além de A, G, C, T e U, os ácidos nucleicos contêm traços de 5-metilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, pseudouridina (ψ) e heterociclos *N*-metilados.

- A maioria dos nucleosídeos contém D-ribose ou 2-desoxi-D-ribose ligada ao *N*-1 de uma pirimidina ou ao *N*-9 de uma purina por uma ligação β-glicosídica, cuja conformação *sin* predomina.
- Os números com apóstrofos localizam a posição do fosfato nos açúcares dos mononucleotídeos (p. ex., 3′-GMP, 5′-dCMP). Os grupos fosforila adicionais ligados ao primeiro por ligações de anidrido ácido formam os nucleosídeos difosfatos e trifosfatos.
- Os nucleosídeos trifosfatos apresentam alto potencial de transferência de grupos e participam na síntese de ligações covalentes. Os fosfodiésteres cíclicos, AMPc e GMPc, atuam como segundos mensageiros intracelulares.
- Os mononucleotídeos ligados por ligações fosfodiéster 3′ → 5′-fosfodiéster formam polinucleotídeos, macromoléculas direcionais com extremidades 3′ e 5′ distintas. No caso de pTpGpT ou TGCATCA, a extremidade 5′ está à esquerda, e todas as ligações fosfodiéster são 3′ → 5′.
- Os análogos sintéticos das bases purínicas e pirimidínicas e seus derivados são usados como agentes antineoplásicos, visto que inibem uma enzima da biossíntese de nucleotídeos ou são incorporados ao DNA ou ao RNA.

REFERÊNCIAS

Adams RLP, Knowler JT, Leader DP: *The Biochemistry of the Nucleic Acids,* 11th ed. Chapman & Hall, 1992.

Blackburn GM, Gait MJ: *Nucleic Acids in Chemistry & Biology.* IRL Press, 1990.

Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C: Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. Pharmacol Rev 2006;58:87.

CAPÍTULO

33

Metabolismo dos Nucleotídeos das Purinas e Pirimidinas

Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Comparar e contrastar os papéis dos ácidos nucleicos provenientes da dieta e da biossíntese *de novo* na produção de purinas e pirimidinas destinadas à biossíntese de polinucleotídeos.
- Explicar por que os antifolatos e os análogos do aminoácido glutamina inibem a biossíntese de purinas.
- Delinear em linhas gerais a sequência de reações que convertem o IMP inicialmente em AMP e GMP e, subsequentemente, em seus nucleosídeos trifosfato.
- Descrever a formação dos desoxirribonucleotídeos (dNTP) a partir de ribonucleotídeos.
- Indicar o papel regulador do PRPP na biossíntese hepática de purinas e a reação específica da biossíntese hepática de purinas que é inibida por retroalimentação pelo AMP e GMP.
- Estabelecer a relevância do controle coordenado da biossíntese de nucleotídeos de purina e pirimidina.
- Identificar as reações inibidas por agentes antineoplásicos.
- Escrever a estrutura do produto final do catabolismo das purinas. Comentar a sua solubilidade e indicar o seu papel na gota, na síndrome de Lesch-Nyhan e na doença de von Gierke.
- Identificar as reações cujo comprometimento leva a sinais e sintomas patológicos modificados.
- Determinar por que existem poucos distúrbios clinicamente significativos do catabolismo das pirimidinas.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Mesmo quando os seres humanos consomem uma alimentação rica em nucleoproteínas, as purinas e as pirimidinas da alimentação não são incorporadas diretamente nos ácidos nucleicos teciduais. Os seres humanos sintetizam os ácidos nucleicos, ATP, NAD^+, coenzima A, etc. a partir de intermediários anfibólicos. Todavia, quando *injetados*, análogos das purinas ou pirimidinas, incluindo agentes antineoplásicos potenciais, podem ser incorporados ao DNA. A biossíntese de ribonucleotídeos trifosfato (NTP) de purinas e pirimidinas e os dNTPs são eventos rigorosamente regulados. Mecanismos de retroalimentação coordenados asseguram a sua produção em quantidades e em ocasiões apropriadas para suprir as demandas fisiológicas variáveis (p. ex., divisão celular). As doenças humanas que envolvem anormalidades no metabolismo das purinas incluem a gota, a síndrome de Lesch-Nyhan, a deficiência da adenosina desaminase e a deficiência da purina nucleosídeo fosforilase. As doenças da biossíntese de pirimidinas são mais raras e incluem as acidúrias oróticas. Diferentemente da baixa solubilidade do ácido úrico formado pelo catabolismo das purinas, os produtos finais do catabolismo das pirimidinas (dióxido de carbono, amônia, β-alanina e γ-aminoisobutirato) são altamente hidrossolúveis. Um distúrbio genético do catabolismo das pirimidinas é a acidúria β-hidroxibutírico, causada pela deficiência total ou parcial da enzima di-hidropirimidina desidrogenase. Esse distúrbio do catabolismo das pirimidinas, também conhecido como uracilúria-timinúria

combinada, também é um distúrbio da biossíntese dos β-aminoácidos, visto que a formação de β-alanina e de β-aminoisobutirato está comprometida. Uma forma não genética pode ser desencadeada pela administração de 5-fluoruracila a pacientes com baixos níveis de di-hidropirimidina-desidrogenase.

AS PURINAS E AS PIRIMIDINAS NÃO SÃO ESSENCIAIS DO PONTO DE VISTA ALIMENTAR

Os tecidos humanos normais são capazes de sintetizar purinas e pirimidinas a partir de intermediários anfibólicos em quantidades e em ocasiões apropriadas para suprir as demandas fisiológicas variáveis. Logo, os ácidos nucleicos e os nucleotídeos ingeridos não são essenciais do ponto de vista alimentar. Após a sua decomposição no trato intestinal, os mononucleotídeos resultantes podem ser absorvidos ou convertidos em bases purínicas e pirimidínicas. Em seguida, as bases purínicas são oxidadas a ácido úrico, que pode ser absorvido e excretado na urina. Embora pouca ou nenhuma purina ou pirimidina alimentar seja incorporada nos ácidos nucleicos dos tecidos, os compostos injetados são incorporados. Por conseguinte, a incorporação da [^{3}H]-timidina injetada ao DNA recém-sintetizado pode ser usada para avaliar a velocidade de síntese do DNA.

BIOSSÍNTESE DOS NUCLEOTÍDEOS PURÍNICOS

Com a exceção dos protozoários parasitos, todas as formas de vida sintetizam nucleotídeos purínicos e pirimidínicos. A síntese a partir de intermediários anfibólicos ocorre em taxas controladas, apropriadas para todas as funções celulares. Para manter a homeostasia, os mecanismos intracelulares percebem e regulam o tamanho dos reservatórios de NTP, que aumentam durante o crescimento ou a regeneração de tecidos, quando as células estão em rápida divisão.

Os nucleotídeos purínicos e pirimidínicos são sintetizados *in vivo*, em taxas compatíveis com as necessidades fisiológicas. Os primeiros pesquisadores da biossíntese de nucleotídeos utilizaram aves e, posteriormente, *Escherichia coli*. Precursores isotópicos do ácido úrico administrados a pombos estabeleceram a origem de cada átomo de uma purina (**Figura 33-1**) e possibilitaram o estudo dos intermediários da biossíntese de purinas. Os tecidos das aves também serviram como fonte de genes clonados, que codificam enzimas da biossíntese de purinas e proteínas reguladoras que controlam a velocidade de biossíntese das purinas.

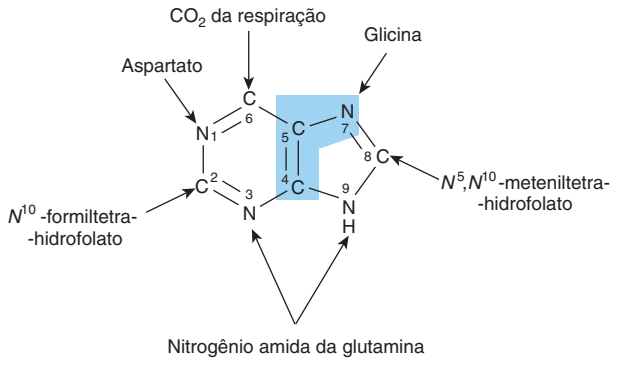


FIGURA 33-1 Fontes dos átomos de nitrogênio e de carbono do anel purínico. Os átomos 4, 5 e 7 (**destacados em azul**) derivam da glicina.

Os três processos que contribuem para a biossíntese dos nucleotídeos purínicos são, por ordem decrescente de importância:

1. Síntese a partir de intermediários anfibólicos (síntese *de novo*).
2. Fosforribosilação das purinas.
3. Fosforilação dos nucleosídeos purínicos.

A INOSINA MONOFOSFATO (IMP) É SINTETIZADA A PARTIR DE INTERMEDIÁRIOS ANFIBÓLICOS

A **Figura 33-2** ilustra os intermediários e as 11 reações catalisadas por enzimas, que convertem o α-D-ribose-5-fosfato em inosina monofosfato (IMP). O primeiro intermediário formado na via *de novo* para a biossíntese de purinas é o 5-fosforribosil-5-pirofosfato (PRPP; estrutura II, Figura 33-2). O PRPP também é um intermediário na biossíntese de nucleotídeos pirimidínicos, NAD^+ e $NADP^+$. Ramificações separadas levam então do IMP ao AMP e GMP (**Figura 33-3**). A transferência subsequente do grupo fosforila do ATP converte o AMP e o GMP em ADP e GDP. A conversão do GDP em GTP envolve a transferência de um segundo grupo fosforila do ATP, enquanto a conversão do ADP em ATP é efetuada principalmente pela fosforilação oxidativa (ver Capítulo 13).

Catalisadores multifuncionais participam na biossíntese de nucleotídeos purínicos

Nos procariotos, cada uma das reações da Figura 33-2 é catalisada por um polipeptídeo diferente. Em contrapartida, as enzimas dos eucariotos são polipeptídeos que apresentam múltiplas atividades catalíticas, cujos sítios catalíticos adjacentes facilitam a transferência dos intermediários entre esses sítios. Três enzimas multifuncionais distintas catalisam as reações ③, ④ e ⑥; as reações ⑦ e ⑧; e as reações ⑩ e ⑪ na Figura 33-2.

Os antifolatos e os análogos da glutamina bloqueiam a biossíntese de nucleotídeos purínicos

Os carbonos acrescentados nas reações ④ e ⑩ da Figura 33-2 são fornecidos por derivados do tetra-hidrofolato. Embora sejam raros nos seres humanos, os estados de deficiência de purinas geralmente refletem uma deficiência de ácido fólico. Os compostos que inibem a formação de tetra-hidrofolatos e que, portanto, bloqueiam a síntese de purinas têm sido utilizados na quimioterapia do câncer. Os compostos inibitórios e as reações que eles inibem incluem a **azasserina** (reação ⑤, Figura 33-2), a

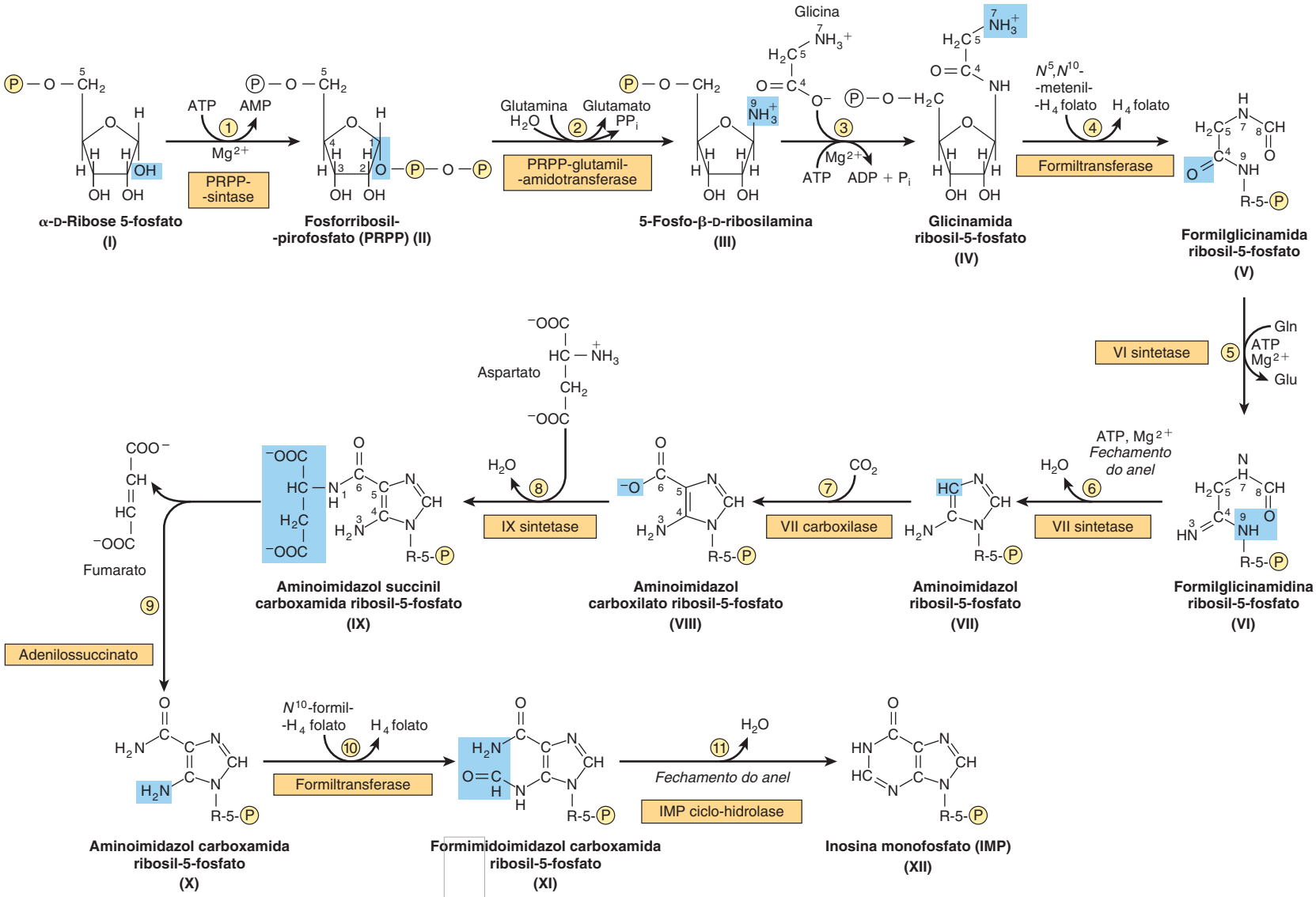


FIGURA 33-2 Biossíntese das purinas a partir da ribose-5-fosfato e do ATP. Ver explicações no texto. (Ⓟ, PO_3^{2-} ou PO_2^-).

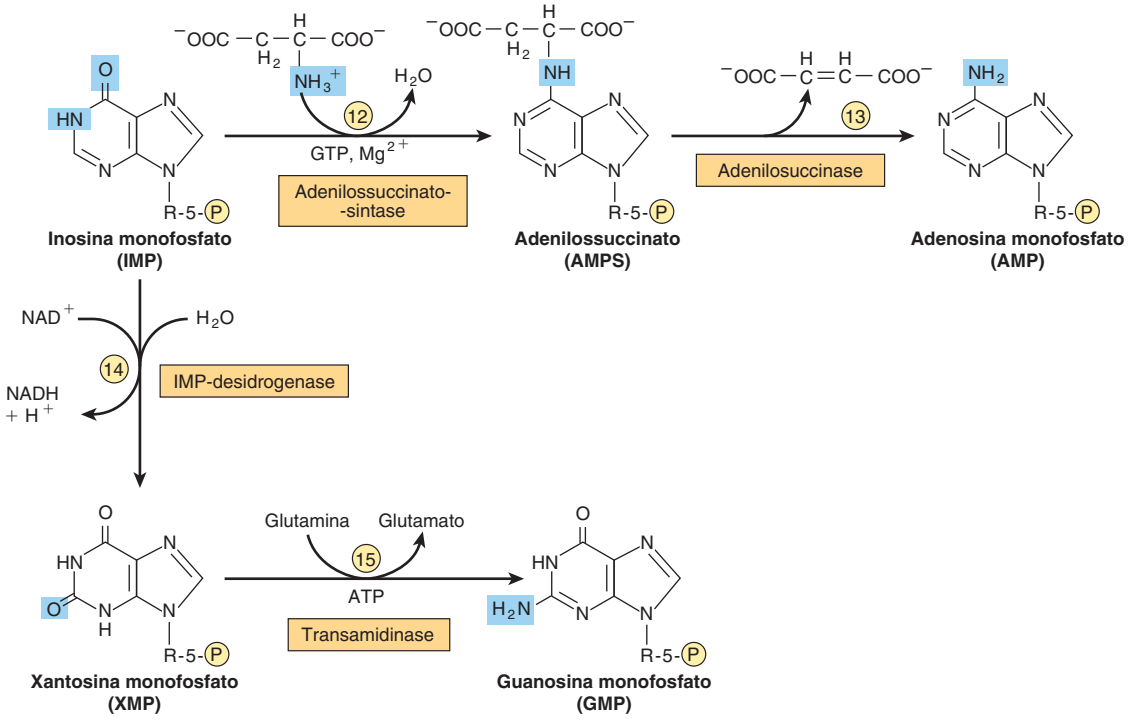


FIGURA 33-3 Conversão do IMP em AMP e GMP.

diazanorleucina (reação ②, Figura 33-2), a **6-mercaptopurina** (reações ⑬ e ⑭, Figura 33-3) e o **ácido micofenólico** (reação ⑭, Figura 33-3).

AS "REAÇÕES DE RECUPERAÇÃO" CONVERTEM AS PURINAS E SEUS NUCLEOSÍDEOS EM MONONUCLEOTÍDEOS

A conversão das purinas, dos seus ribonucleo**sídeos** e seus desoxirribonucleo**sídeos** em mononucle**otídeos** envolve "vias de recuperação", que necessitam de muito menos energia do que a síntese *de novo*. O mecanismo mais importante envolve a fosforribosilação pelo PRPP (estrutura II, Figura 33-2) de uma purina (Pu) livre para formar uma purina 5′-mononucleotídeo (Pu-RP).

$$Pu + PR\text{-}PP \rightarrow Pu\text{-}RP + PP_i$$

A transferência de fosforila do ATP, catalisada por adenosina e hipoxantina-fosforribosil transferases, converte a adenina, a hipoxantina e a guanina em seus mononucleotídeos (**Figura 33-4**).

Um segundo mecanismo de recuperação envolve a transferência do grupo fosforila do ATP para uma purina ribonucleo**sídeo** (Pu-R):

$$Pu\text{-}R + ATP \rightarrow PuR\text{-}P + ADP$$

A fosforilação dos nucleotídeos purínicos, que é catalisada pela adenosina quinase, converte a adenosina e a desoxiadenosina em AMP e dAMP. De modo semelhante, a desoxicitidina quinase fosforila a desoxicitidina e a 2′-desoxiguanosina, formando dCMP e dGMP.

O fígado, principal órgão de biossíntese dos nucleotídeos purínicos, fornece purinas e nucleosídeos purínicos para a via de recuperação e para utilização por tecidos incapazes de efetuar a sua biossíntese. O tecido cerebral humano apresenta baixos níveis de PRPP glutamil amidotransferase (reação ②, Figura 33-2) e, portanto, depende, em parte, das purinas exógenas. Os eritrócitos e os leucócitos polimorfonucleares são incapazes de sintetizar a 5-fosforribosilamina (estrutura III, Figura 33-2) e, por conseguinte, utilizam purinas exógenas para a síntese de nucleotídeos.

A BIOSSÍNTESE HEPÁTICA DE PURINAS É RIGOROSAMENTE REGULADA

A retroalimentação por AMP e por GMP regula a PRPP glutamil amidotransferase

A biossíntese de IMP requer um gasto energético. Além do ATP, ocorre consumo de glicina, glutamina, aspartato e derivados do tetra-hidrofolato reduzido. Assim, é vantajoso, para a sobrevida, regular estreitamente a biossíntese de purinas em resposta às necessidades fisiológicas variáveis. O determinante global da taxa de biossíntese *de novo* dos nucleotídeos purínicos é a concentração de PRPP. Isso depende da taxa de síntese, utilização, degradação e regulação do PRPP. A taxa de síntese do PRPP depende da disponibilidade de ribose-5-fosfato e da atividade da

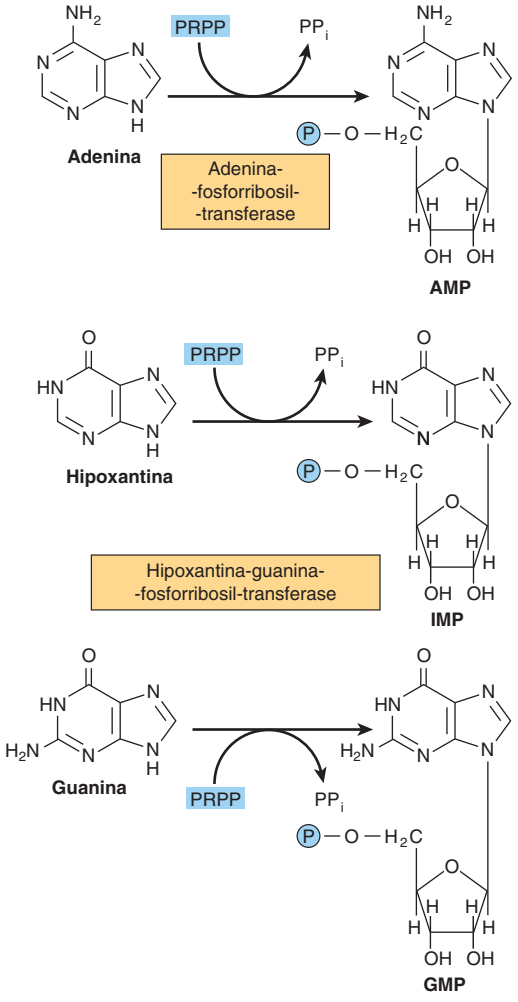


FIGURA 33-4 Fosforribosilação da adenina, hipoxantina e guanina para formar AMP, IMP e GMP, respectivamente.

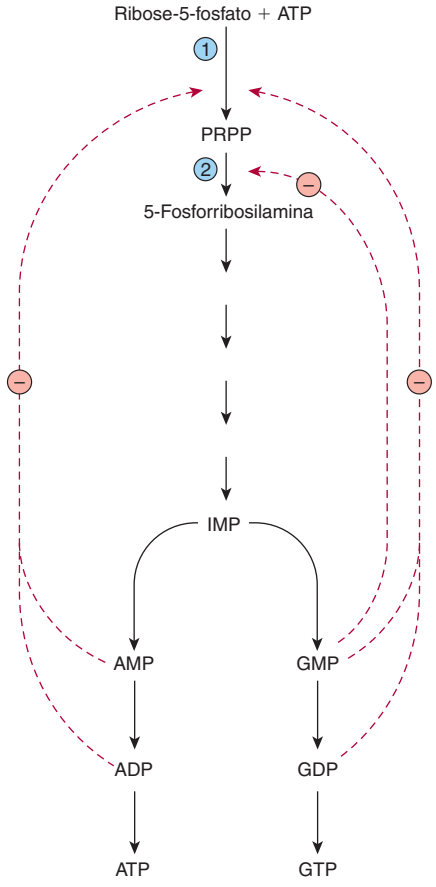


FIGURA 33-5 Controle da taxa de biossíntese *de novo* de nucleotídeos purínicos. As reações ① e ② são catalisadas pela PRPP-sintase e pela PRPP-glutamil-amidotransferase, respectivamente. As linhas contínuas representam o fluxo químico. As linhas tracejadas representam a inibição por retroalimentação por intermediários da via.

PRPP sintase (reação ②, **Figura 33-5**), enzima cuja atividade é inibida por retroalimentação pelo AMP, ADP, GMP e GDP. Portanto, a presença de níveis elevados desses nucleosídeos fosfatos sinaliza uma diminuição global fisiologicamente apropriada de sua biossíntese.

A retroalimentação por AMP e por GMP regula a sua formação a partir do IMP

Além da regulação em nível da biossíntese de PRPP, outros mecanismos regulam a conversão do IMP em ATP e GTP. Esses mecanismos estão resumidos na **Figura 33-6**. O AMP inibe por retroalimentação a adenilossuccinato sintase (reação ⑫, Figura 33-3), enquanto o GMP inibe a IMP desidrogenase (reação ⑭, Figura 33-3). Além disso, a conversão do IMP em adenilossuccinato a caminho do AMP (reação ⑫, Figura 33-3) requer a presença de GTP, enquanto a conversão do xantinilato (XMP) em GMP requer ATP. Portanto, essa regulação cruzada entre as vias do metabolismo do IMP serve para equilibrar a biossíntese de nucleosídeos trifosfatos purínicos ao diminuir a síntese de nucleotídeo

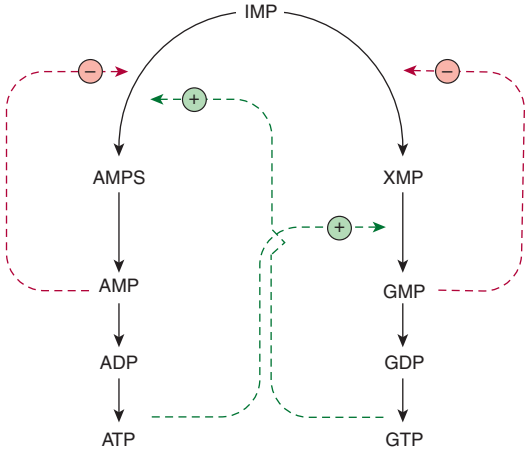


FIGURA 33-6 Regulação da conversão do IMP em nucleotídeos de adenosina e nucleotídeos de guanosina. As linhas contínuas representam o fluxo químico. As linhas verdes tracejadas representam alças de retroalimentação positiva ⊕, enquanto as linhas vermelhas tracejadas representam alças de retroalimentação negativa ⊖. As abreviaturas incluem AMPS (adenilossuccinato) e XMP (xantosina monofosfato), cujas estruturas são apresentadas na Figura 33-3.

purínico quando há deficiência do outro nucleotídeo. O AMP e o GMP também inibem a hipoxantina-guanina fosforribosil transferase, que converte a hipoxantina e a guanina em IMP e GMP (Figura 33-4), enquanto o GMP inibe por retroalimentação a PRPP glutamil amidotransferase (reação ②, Figura 33-2).

A REDUÇÃO DOS RIBONUCLEOSÍDEOS DIFOSFATO PRODUZ DESOXIRRIBONUCLEOSÍDEOS DIFOSFATO

A redução do grupo 2′-hidroxila dos ribonucleotídeos purínicos e pirimidínicos, que é catalisada pelo complexo da **ribonucleotídeo-redutase** (**Figura 33-7**), fornece os desoxirribonucleosídeos difosfato (dNDPs) necessários tanto para a síntese quanto para o reparo do DNA (ver Capítulo 35). O complexo enzimático só é funcional quando as células sintetizam ativamente o DNA. A redução requer tiorredoxina, tiorredoxina-redutase e NADPH. O redutor imediato, a tiorredoxina reduzida, é produzido pela NADPH: tiorredoxina-redutase (Figura 33-7). A redução dos ribonucleosídeos difosfato (NDPs) a dNDPs está sujeita a controles reguladores complexos, que possibilitam a produção equilibrada de dNTPs para a síntese de DNA (**Figura 33-8**).

BIOSSÍNTESE DE NUCLEOTÍDEOS PIRIMIDÍNICOS

A **Figura 33-9** ilustra os intermediários e as enzimas da biossíntese de nucleotídeos pirimidínicos. O catalisador para a reação inicial é a carbamoil-fosfato-sintase II *citosólica,* uma enzima diferente da carbamoil-fosfato-sintase I *mitocondrial* da síntese da ureia (ver Figura 28-13). A compartimentalização proporciona então um reservatório independente de carbamoil fosfato para cada processo. O PRPP, que participa no início da síntese de nucleotídeos purínicos (Figura 33-2), é um componente muito mais tardio na biossíntese de pirimidinas. O exame dos componentes da reação na Figura 33-9 revela que, à semelhança da biossíntese de pirimidinas, a biossíntese de nucleotídeos purínicos é de alto custo energético.

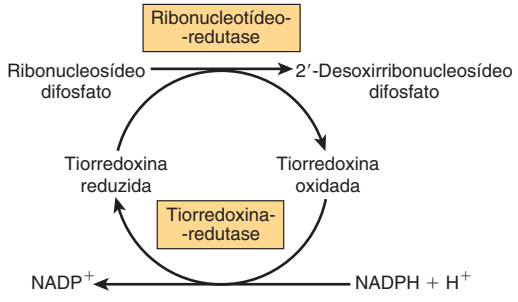


FIGURA 33-7 Redução de ribonucleosídeo difosfato a 2′-desoxirribonucleosídeo difosfato.

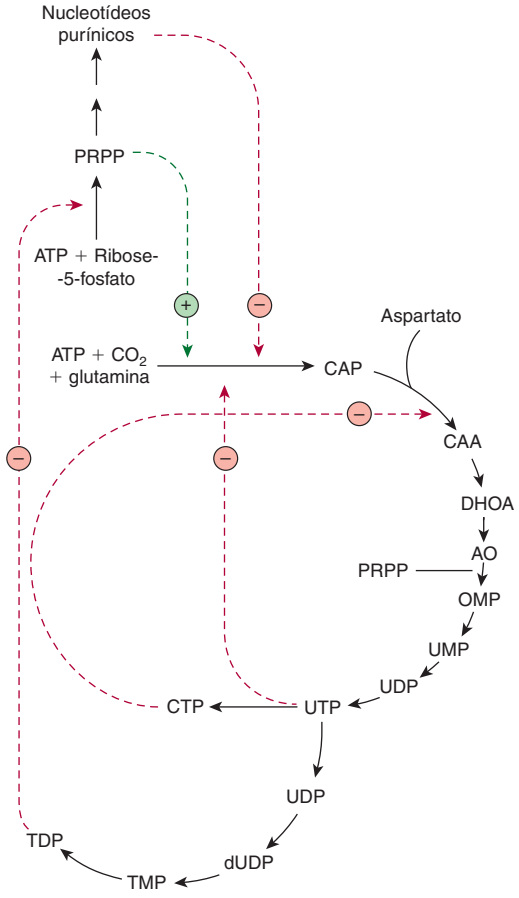


FIGURA 33-8 Aspectos reguladores da biossíntese de ribonucleotídeos purínicos e pirimidínicos e redução a seus respectivos 2′-desoxirribonucleotídeos. A linha verde tracejada representa uma alça de retroalimentação positiva. As linhas tracejadas vermelhas representam alças de retroalimentação negativa. As abreviaturas dos intermediários na biossíntese de nucleotídeos pirimidínicos cujas estruturas são apresentadas na Figura 33-9 são: (CAA, carbomoil aspartato; DHOA, di-hidroorotato; AO, ácido orótico; OMP, orotidina monofosfato; e PRPP fosforribosil pirofosfato).

As primeiras reações da biossíntese de pirimidinas são catalisadas por proteínas multifuncionais

Cinco das seis primeiras atividades enzimáticas na biossíntese de pirimidinas residem em **polipeptídeos multifuncionais**. Um desses polipeptídeos catalisa as primeiras três reações da Figura 33-9. Uma segunda enzima bifuncional catalisa as reações ⑤ e ⑥ da Figura 33-9. A estreita proximidade de múltiplos sítios ativos em um polipeptídeo funcional facilita a canalização eficiente dos intermediários da biossíntese de pirimidinas.

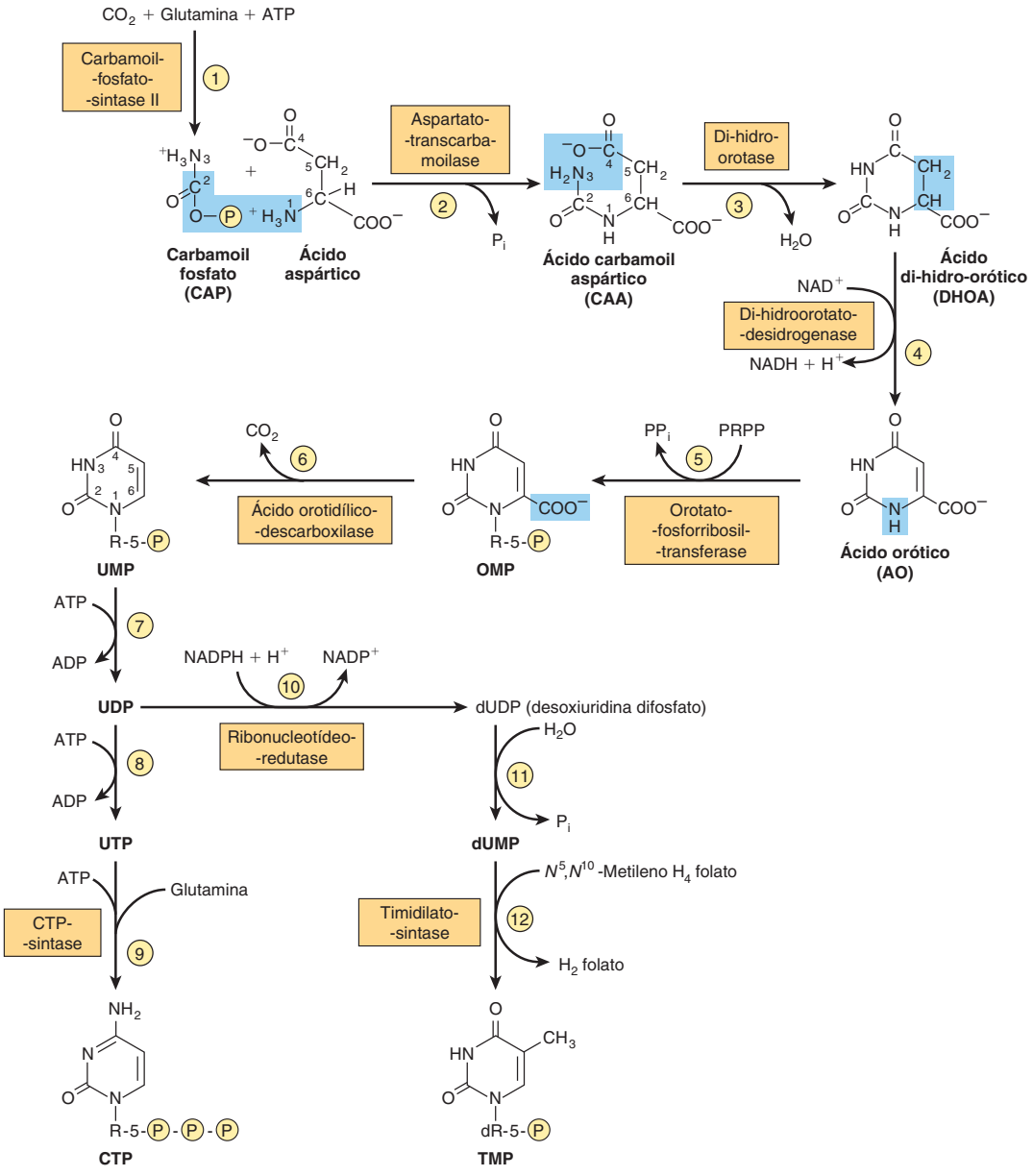


FIGURA 33-9 A via de biossíntese dos nucleotídeos pirimidínicos.

OS DESOXIRRIBONUCLEOSÍDEOS DE URACILA E DE CITOSINA SÃO RECUPERADOS

A adenina, a guanina e a hipoxantina liberadas durante a renovação dos ácidos nucleicos, particularmente do RNA mensageiro, são reconvertidas em nucleosídeos trifosfato pelas denominadas vias de recuperação. Enquanto as células de mamíferos reutilizam algumas pirimidinas *livres,* as "reações de recuperação" convertem os ribonucleosídeos pirimidínicos, uridina e citidina, e os desoxirribonucleosídeos pirimidínicos, timidina e desoxicitidina, em seus respectivos nucleotídeos.

$$\text{Guanina} + \text{PRPP} \rightarrow \text{GMP} + \text{PP}_i$$
$$\text{Hipoxantina} + \text{PRPP} \rightarrow \text{IMP} + \text{PP}_i$$

As fosforribosiltransferases (quinases) catalisam a transferência do grupo γ-fosforila do ATP para os difosfatos de 2′-desoxicitidina, 2′-desoxiguanosina e 2′-desoxiadenosina, convertendo-os nos nucleosídeos trifosfato correspondentes.

$$\text{NDP} + \text{ATP} \rightarrow \text{NTP} + \text{ADP}$$
$$\text{dNDP} + \text{ATP} \rightarrow \text{dNTP} + \text{ADP}$$

O metotrexato bloqueia a redução do di-hidrofolato

A reação catalisada pela timidilato-sintase (reação ⑫ da Figura 33-9) é a única reação da biossíntese de nucleotídeos pirimidínicos que requer a presença de um derivado do tetra-hidrofolato. Durante essa reação, o grupo metileno do N^5,N^{10}-metileno-tetra-hidrofolato é reduzido ao grupo metila, que é transferido para a posição 5 do anel de pirimidina, enquanto o tetra-hidrofolato é oxidado a di-hidrofolato. Para que ocorra a síntese subsequente de pirimidinas, o di-hidrofolato precisa ser novamente reduzido a tetra-hidrofolato. Essa redução, que é catalisada pela di-hidrofolato-redutase, é inibida pelo **metotrexato.** Portanto, as células em divisão, que precisam gerar TMP e di-hidrofolato, são particularmente sensíveis a inibidores da di-hidrofolato-redutase, como o metotrexato, um agente antineoplásico.

Alguns análogos das pirimidinas atuam como substratos para enzimas da biossíntese de nucleotídeos pirimidínicos

O **alopurinol** e o agente neoplásico, a **5-fluoruracila** (ver Figura 32-13), são substratos alternativos da orotato-fosforribosil-transferase (reação ⑤, Figura 33-9). Ambos os fármacos são fosforribosilados, e o alopurinol é convertido em um nucleotídeo em que o ribosil fosfato é ligado ao *N*-1 do anel pirimidínico.

REGULAÇÃO DA BIOSSÍNTESE DOS NUCLEOTÍDEOS PIRIMIDÍNICOS

Tanto a expressão gênica quanto a atividade enzimática são reguladas

As atividades da primeira e da segunda enzima envolvidas na biossíntese de nucleotídeos pirimidínicos são controladas por regulação alostérica. A carbamoil-fosfato-sintase II (reação ①, Figura 33-9) é inibida pelo UTP e por nucleotídeos purínicos, porém é ativada pelo PRPP. A aspartato-transcarbamoilase (reação ②, Figura 33-9) é inibida pelo CTP, porém ativada pelo ATP (**Figura 33-10**). Além disso, as primeiras três e as últimas duas enzimas da via são reguladas por repressão e desrepressão coordenadas.

As biossínteses dos nucleotídeos purínicos e pirimidínicos são reguladas de modo coordenado

As biossínteses das purinas e das pirimidinas correm paralelamente uma à outra do ponto de vista quantitativo, isto é, mol por mol, sugerindo um controle coordenado de sua biossíntese. Vários sítios de *regulação cruzada* caracterizam as vias que levam à biossíntese dos nucleotídeos purínicos e pirimidínicos. A PRPP (reação ①, Figura 33-2), que forma um precursor essencial a ambos os processos, é inibida por retroalimentação por ambos os nucleotídeos purínicos e pirimidínicos.

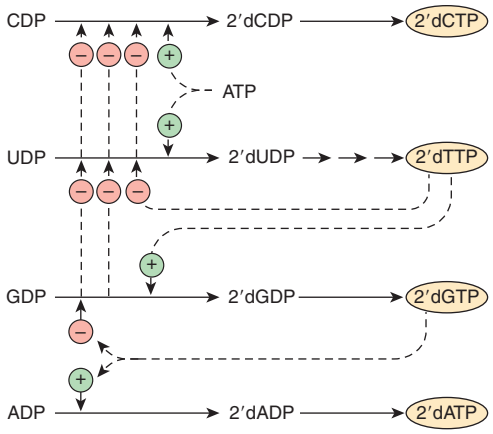


FIGURA 33-10 Controle da biossíntese de nucleotídeos pirimidínicos. As linhas contínuas representam o fluxo químico. As linhas verdes tracejadas representam uma regulação por retroalimentação positiva ⊕, e as linhas vermelhas tracejadas, uma regulação por retroalimentação negativa ⊖.

OS SERES HUMANOS CATABOLIZAM AS PURINAS A ÁCIDO ÚRICO

Os seres humanos convertem a adenosina e a guanosina em ácido úrico (**Figura 33-11**). A adenosina é inicialmente convertida em inosina pela adenosina desaminase. Nos mamíferos, com exceção dos primatas superiores, a uricase converte o ácido úrico em alantoína, um produto hidrossolúvel. Todavia, como os seres humanos carecem de uricase, o produto final do catabolismo das purinas é o ácido úrico.

A GOTA É UM DISTÚRBIO METABÓLICO DO CATABOLISMO DAS PURINAS

Vários defeitos genéticos da PRPP sintase (reação ①, Figura 33-2) manifestam-se clinicamente na forma de gota. Cada um desses defeitos – por exemplo, elevação de $V_{máx.}$, maior afinidade pela ribose-5-fosfato ou resistência à inibição por retroalimentação – resulta em produção ou excreção excessiva dos catabólitos das purinas. Quando os níveis séricos de urato ultrapassam o limite de solubilidade, o urato de sódio cristaliza nos tecidos moles e nas articulações e provoca uma reação inflamatória conhecida como **artrite gotosa**. Entretanto, a maioria dos casos de gota reflete anormalidades no processamento renal do ácido úrico.

OUTROS DISTÚRBIOS DO CATABOLISMO DAS PURINAS

Embora os estados de deficiência de purinas sejam raros nos seres humanos, existem numerosos distúrbios genéticos do catabolismo das purinas. As **hiperuricemias** podem ser diferenciadas com base na excreção de quantidades normais ou excessivas de uratos totais. Algumas hiperuricemias refletem defeitos enzimáticos específicos. Outras são secundárias a doenças, como câncer ou psoríase, que aumentam a renovação dos tecidos.

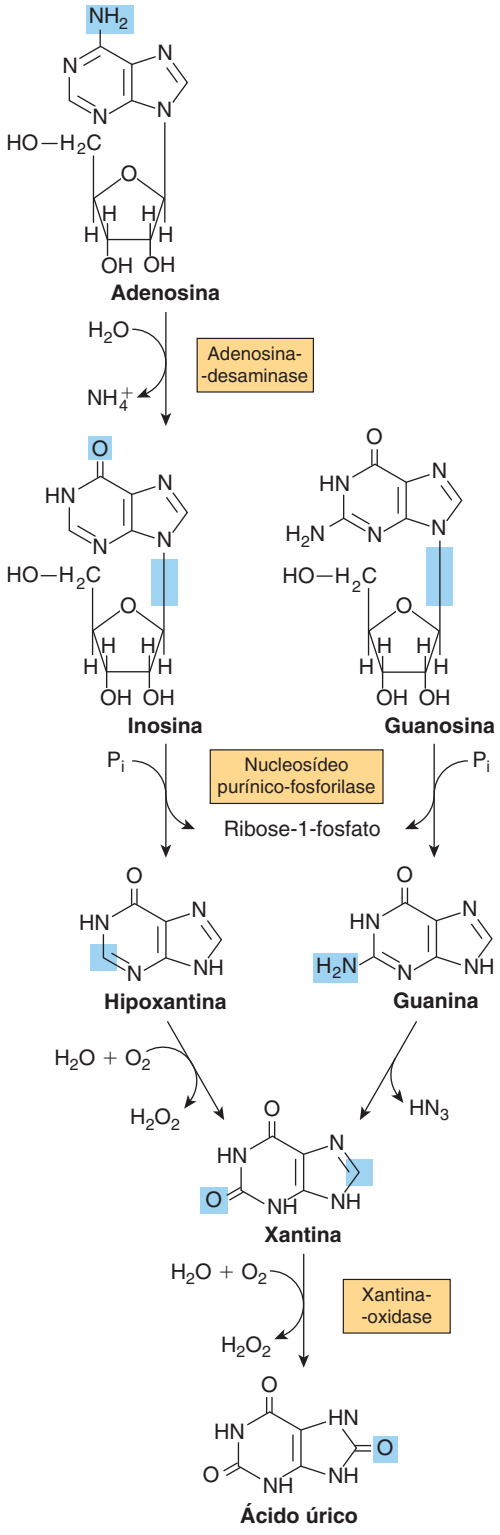


FIGURA 33-11 Formação do ácido úrico a partir de nucleosídeos purínicos por meio das bases purínicas hipoxantina, xantina e guanina. Os desoxirribonucleosídeos purínicos são degradados pela mesma via catabólica e enzimas, todas presentes na mucosa do trato gastrintestinal dos mamíferos.

Síndrome de Lesch-Nyhan

A síndrome de Lesch-Nyhan, uma hiperuricemia causada por produção excessiva caracterizada por episódios frequentes de litíase por ácido úrico e por uma síndrome bizarra de automutilação, reflete um defeito da **hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase**, uma das enzimas que atua na recuperação de purinas (Figura 33-4). A elevação concomitante do PRPP intracelular resulta em produção excessiva de purinas. As mutações que diminuem ou suprimem a atividade da hipoxantina-guanina fosforribosil transferase incluem deleções, mutações de fase de leitura, substituições de bases e *splicing* anormal do mRNA.

Doença de von Gierke

Na doença de von Gierke (**deficiência da glicose-6-fosfatase**), a produção excessiva de purinas e a hiperuricemia ocorrem secundariamente à geração aumentada do precursor do PRPP, a ribose-5-fosfato. A acidose lática associada eleva o limiar renal para o urato, com consequente aumento dos uratos corporais totais.

Hipouricemia

A hipouricemia e a excreção aumentada de hipoxantina e xantina estão associadas à **deficiência da xantina-oxidase** (Figura 33-11), devido a um defeito genético ou à presença de lesão hepática grave. Os pacientes com deficiência enzimática grave podem apresentar xantinúria e litíase de xantina.

Deficiências da adenosina-desaminase e da nucleosídeo purínico fosforilase

A **deficiência da adenosina-desaminase** (Figura 33-11) está associada a uma doença por imunodeficiência na qual tanto os linfócitos derivados do timo (células T) quanto os linfócitos derivados da medula óssea (células B) são escassos e disfuncionais. Os pacientes apresentam imunodeficiência grave. Na ausência de reposição enzimática ou de transplante de medula óssea, os lactentes frequentemente morrem de infecções fatais. A **deficiência da nucleosídeo purínico-fosforilase** está associada a uma grave deficiência de células T, porém com função aparentemente normal das células B. As disfunções imunes parecem resultar do acúmulo de dGTP e dATP, que inibem a ribonucleotídeo redutase e, portanto, esgotam os precursores de DNA das células. A **Tabela 33-1** fornece um resumo dos distúrbios conhecidos do metabolismo das purinas.

O CATABOLISMO DAS PIRIMIDINAS PRODUZ METABÓLITOS HIDROSSOLÚVEIS

Diferentemente dos produtos de baixa solubilidade do catabolismo das purinas, o catabolismo das pirimidinas forma produtos altamente hidrossolúveis – CO_2, NH_3, β-alanina e β-aminoisobutirato (**Figura 33-12**). Os seres humanos transaminam o β-aminoisobutirato em metilmalonato semialdeído que, em seguida, forma succinil-CoA (ver Figura 20-2). A excreção de β-aminoisobutirato aumenta na leucemia e na exposição intensa à radiação por raios X, devido à destruição aumentada do DNA.

TABELA 33-1 Distúrbios metabólicos do metabolismo das purinas e das pirimidinas

Enzima deficiente	Número de catálogo da enzima	Referência OMIM	Principais sinais e sintomas	Figura e reação
Metabolismo das purinas				
Hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase	2.4.2.8	308.000	Síndrome de Lesch-Nyhan. Uricemia, automutilação	33-4 ②
PRPP-sintase	2.7.6.1	311.860	Gota; artrite gotosa	33-2 ①
Adenosina-desaminase	3.5.4.6	102.700	Grave comprometimento do sistema imune	33-1 ①
Nucleosídeo purínico-fosforilase	2.4.2.1	164.050	Distúrbios autoimunes; infecções benignas e oportunistas	33-11 ②
Metabolismo das pirimidinas				
Di-hidropirimidina-desidrogenase	1.3.1.2	274.270	Pode ocorrer toxicidade da 5-fluoruracila; também um substrato para esta desidrogenase	33-12 ②
Orotato fosforribosil-transferase e ácido orotidílico-descarboxilase	2.4.2.10 e 4.1.1.23	258.900	Acidúria orótica tipo 1; anemia megaloblástica	33-9 ⑤ e ⑥
Ácido orotidílico-descarboxilase	4.1.1.23	258.920	Acidúria orótica tipo 2	33-9 ⑥

Todavia, alguns indivíduos de ascendência chinesa ou japonesa excretam rotineiramente o β-aminoisobutirato. Os distúrbios do metabolismo da β-alanina e do β-aminoisobutirato surgem de defeitos das enzimas envolvidas no catabolismo das pirimidinas. Incluem a **acidúria β-hidroxibutírica**, um distúrbio devido à deficiência total ou parcial da enzima **di-hidropirimidina-desidrogenase** (Figura 33-12). A doença genética reflete uma ausência da enzima. Um distúrbio do catabolismo das pirimidinas, conhecido como uracilúria-timinúria combinada, também é um distúrbio do metabolismo de β-aminoácidos, visto que ocorre comprometimento na *formação* de β-alanina e β-aminoisobutirato. Quando causado por um erro inato, surgem complicações neurológicas graves. Uma forma não genética é desencadeada pela administração do agente antineoplásico, a 5-fluoruracila (ver Figura 32-13), a pacientes com baixos níveis de di-hidropirimidina-desidrogenase.

A pseudouridina é excretada de modo inalterado

Nenhuma enzima humana catalisa a hidrólise ou a fosforólise da pseudouridina (ψ) derivada da degradação de moléculas de RNA. Como consequência, este nucleotídeo incomum é excretado de modo inalterado na urina dos indivíduos normais. A pseudouridina foi, de fato, isolada pela primeira vez da urina humana (**Figura 33-13**).

A PRODUÇÃO EXCESSIVA DE CATABÓLITOS PIRIMIDÍNICOS SÓ ESTÁ RARAMENTE ASSOCIADA A ANORMALIDADES CLINICAMENTE SIGNIFICATIVAS

Como os produtos finais do catabolismo das pirimidinas são altamente hidrossolúveis, a produção excessiva de pirimidinas resulta em poucos sinais ou sintomas clínicos. A Tabela 33-1 fornece uma lista das exceções. Na hiperuricemia associada à produção excessiva de PRPP, ocorre formação excessiva de nucleotídeos pirimidínicos e excreção aumentada de β-alanina. Como o N^5,N^{10}-metileno-tetra-hidrofolato é necessário para a síntese do timidilato, os distúrbios do metabolismo do folato e da vitamina B_{12} resultam em deficiência de TMP.

Acidúria orótica

A acidúria orótica que acompanha a **síndrome de Reye** provavelmente é uma consequência da incapacidade das mitocôndrias gravemente danificadas de utilizar o carbamoil fosfato, que fica então disponível para a produção excessiva de ácido orótico no citosol. A **acidúria orótica tipo I** reflete uma deficiência da orotato fosforribosil transferase e da orotidilato descarboxilase (reações ⑤ e ⑥, Figura 33-9). A **acidúria orótica tipo II**, mais rara, é causada pela deficiência apenas da orotidilato-descarboxilase (reação ⑥, Figura 33-9).

A deficiência de uma enzima do ciclo da ureia resulta em excreção de precursores das pirimidinas

A excreção aumentada de ácido orótico, uracila e uridina acompanha uma deficiência da ornitina transcarbamoilase mitocondrial do fígado (ver reação ②, Figura 28-13). O carbamoil fosfato em excesso sai do citosol, onde estimula a biossíntese de nucleotídeos pirimidínicos. A consequente **acidúria orótica** moderada é agravada por alimentos ricos em nitrogênio.

Determinados fármacos podem precipitar acidúria orótica

O **alopurinol** (ver Figura 32-13), um substrato alternativo para a orotato fosforribosil-transferase (reação ⑤, Figura 33-9), com-

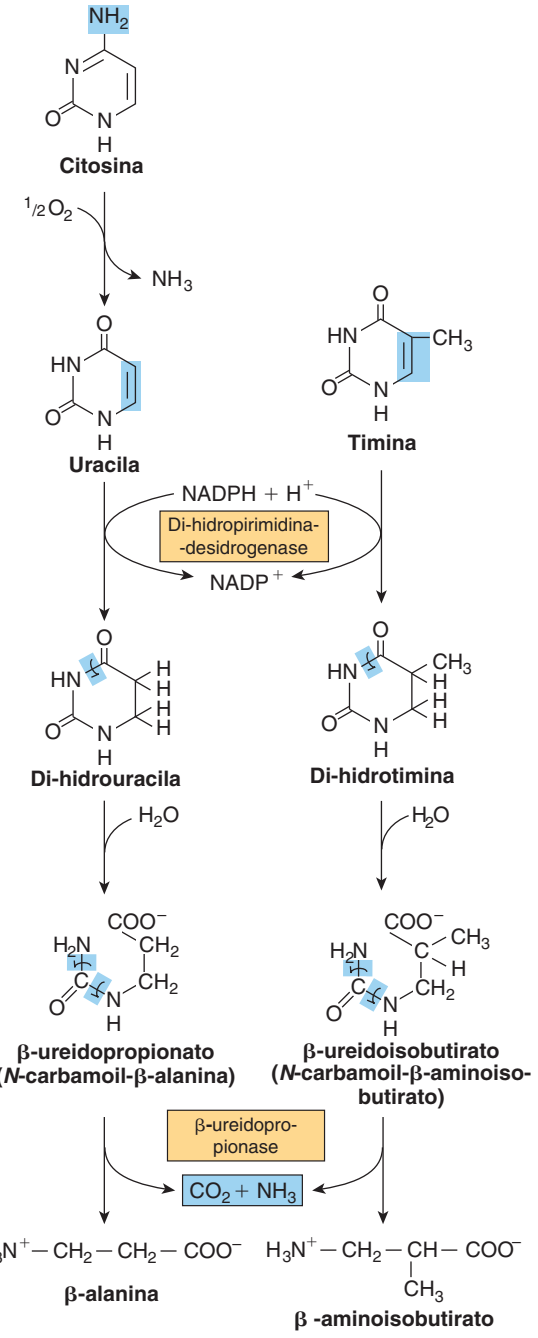


FIGURA 33-12 Catabolismo das pirimidinas. A β-ureidopropionase hepática catalisa a formação de β-alanina e β-aminoisobutirato a partir de seus precursores pirimidínicos.

pete com o ácido orótico. O produto nucleotídico resultante também inibe a orotidilato descarboxilase (reação ⑥, Figura 33-9), resultando em **acidúria orótica** e **orotidinúria**. A 6-azauridina, após conversão em 6-azauridilato, também inibe competitivamente a orotidilato descarboxilase (reação ⑥, Figura 33-9), aumentando a excreção de ácido orótico e orotidina. Foram identificados quatro genes que codificam transportadores do urato. Duas das proteínas codificadas estão localizadas na membrana apical das células tubulares proximais.

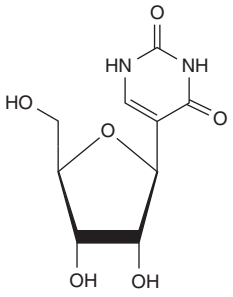


FIGURA 33-13 Pseudouridina, na qual a ribose está ligada ao C5 da uridina.

RESUMO

- Os ácidos nucleicos ingeridos são degradados a purinas e pirimidinas. Novas purinas e pirimidinas são formadas a partir de intermediários anfibólicos e, portanto, não são nutricionalmente essenciais.
- Várias reações de biossíntese do IMP necessitam de derivados do folato e da glutamina. Consequentemente, os antifolatos e os análogos da glutamina inibem a biossíntese de purinas.
- A oxidação e a aminação do IMP formam AMP e GMP, e a transferência subsequente de grupo fosforila do ATP forma ADP e GDP. A transferência de outro grupo fosforila do ATP para o GTP produz GTP. O ADP é convertido em ATP por fosforilação oxidativa. A redução dos NDPs forma dNDPs.
- A biossíntese hepática de nucleotídeos purínicos é rigorosamente regulada pelo tamanho do reservatório de PRPP e por inibição por retroalimentação da PRPP-glutamil--amidotransferase pelo AMP e GMP.
- A regulação coordenada da biossíntese dos nucleotídeos purínicos e pirimidínicos assegura a sua presença em proporções apropriadas para a síntese de ácidos nucleicos e outras necessidades metabólicas do organismo.
- Os seres humanos catabolizam as purinas em ácido úrico (pK_a de 5,8), que está presente na forma de ácido relativamente insolúvel em pH ácido ou na forma de sal de urato de sódio mais solúvel em pH próximo da neutralidade. A presença de cristais de urato é diagnóstica da gota. Outros distúrbios do catabolismo das purinas incluem a síndrome de Lesch-Nyhan, a doença de von Gierke e as hipouricemias.
- Como os catabólitos das pirimidinas são hidrossolúveis, a sua produção excessiva não resulta em anormalidades clínicas. Todavia, a excreção de precursores pirimidínicos pode resultar de uma deficiência de ornitina transcarbamoilase, visto que o carbamoil fosfato em excesso fica disponível para a biossíntese de pirimidinas.

REFERÊNCIAS

Chow EL, Cherry JD, Harrison R, et al: Reassessing Reye syndrome. Arch Pediatr Adolesc Med 2003;157:1241.

Christopherson RI, Lyons SD, Wilson PK: Inhibitors of de novo nucleotide biosynthesis as drugs. Acc Chem Res 2002;35:961.

Kamal MA, Christopherson RI: Accumulation of 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate in human CCRF-CEM leukemia cells treated with antifolates. Int J Biochem Cell Biol 2004;36:957.

Lipkowitz MS, Leal-Pinto E, Rappoport JZ, et al: Functional reconstitution, membrane targeting, genomic structure, and chromosomal localization of a human urate transporter. J Clin Invest 2001;107:1103.

Martinez J, Dugaiczyk LJ, Zielinski R, et al: Human genetic disorders, a phylogenetic perspective. J Mol Biol 2001; 308:587.

Moyer RA, John DS: Acute gout precipitated by total parenteral nutrition. J Rheumatol 2003;30:849.

Nofech-Mozes Y, Blaser SI, Kobayashi J, et al: Neurologic abnormalities in patients with adenosine deaminase deficiency. Pediatr Neurol 2007;37:218.

Rafey MA, Lipkowitz MS, Leal-Pinto E, et al: Uric acid transport. Curr Opin Nephrol Hypertens 2003;12:511.

Scriver CR, Sly WS, Childs B, et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 8th ed. McGraw-Hill, 2001.

Torres RJ, Puig JG: Hypoxanthine-guanine phosophoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch–Nyhan syndrome. Orphanet J Rare Dis 2007;2:48.

Wu VC, Huang JW, Hsueh PR, et al: Renal hypouricemia is an ominous sign in patients with severe acute respiratory syndrome. Am J Kidney Dis 2005;45:88.

CAPÍTULO

34

Estrutura e Função do Ácido Nucleico

P. Anthony Weil, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Reconhecer a estrutura química monomérica e polimérica do material genético, o ácido desoxirribonucleico, ou DNA, que é encontrado no interior do núcleo das células eucarióticas.
- Explicar por que o DNA eucariótico nuclear genômico é de fita dupla e altamente carregado negativamente.
- Compreender um esboço de como a informação genética do DNA pode ser duplicada com fidelidade.
- Entender como a informação genética do DNA é transcrita, ou copiada, para uma miríade de diferentes formas de ácidos ribonucleicos (RNA).
- Inferir que uma forma de RNA rico em informação, o chamado RNA mensageiro (mRNA), pode ser subsequentemente traduzido em proteínas, as moléculas que constroem as estruturas, as formas e, em última análise, as funções das células individuais, dos tecidos e dos órgãos.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A descoberta de que a informação genética é codificada ao longo do comprimento de uma molécula composta de apenas quatro tipos de unidades monoméricas foi uma das principais conquistas científicas do século XX. Essa molécula polimérica, o **ácido desoxirribonucleico** (**DNA**), é a base química da hereditariedade e está organizada em genes, as unidades fundamentais da informação genética. A via de informação básica – isto é, o DNA, que direciona a síntese de RNA, que, por sua vez, tanto direciona quanto regula a síntese proteica – foi elucidada. Os genes não funcionam autonomamente; suas replicações e funções são controladas por vários produtos gênicos, geralmente em colaboração com componentes de várias vias de transdução de sinais. O conhecimento da estrutura e função dos ácidos nucleicos é essencial na compreensão da genética e de muitos aspectos da fisiopatologia bem como da base genética de doenças.

O DNA CONTÉM A INFORMAÇÃO GENÉTICA

A demonstração de que o DNA continha a informação genética foi feita pela primeira vez em 1944 em uma série de experimentos realizados por Avery, MacLeod e McCarty. Eles mostraram que a determinação genética do caráter (tipo) da cápsula de um pneumococo específico poderia ser transmitida para outro com um tipo de cápsula diferente, por meio da introdução de DNA purificado do primeiro coco para o último. Esses autores chamaram o agente (posteriormente demonstrado como o DNA) que realizava a mudança de "fator de transformação". Posteriormente, esse tipo de manipulação genética se tornou comum. Experimentos semelhantes foram recentemente realizados com leveduras, plantas cultivadas e células de mamíferos. Embriões de insetos e mamíferos foram usados como recipientes, e DNAs clonados de forma molecular como os doadores de informação genética.

O DNA contém quatro desoxinucleotídeos

A natureza química das unidades monoméricas de desoxinucleotídeos de DNA – **desoxiadenilato**, **desoxiguanilato**, **desoxicitidilato** e **timidilato** – está descrita no Capítulo 32. Essas unidades monoméricas de DNA estão dispostas em uma forma polimérica de ligações 3′,5′-fosfodiéster, que constituem uma fita simples, como representado na **Figura 34-1**. O conteúdo de informações do DNA (o código genético) reside na sequência em que esses monômeros – os desoxirribonucleotídeos purina e pirimidina –

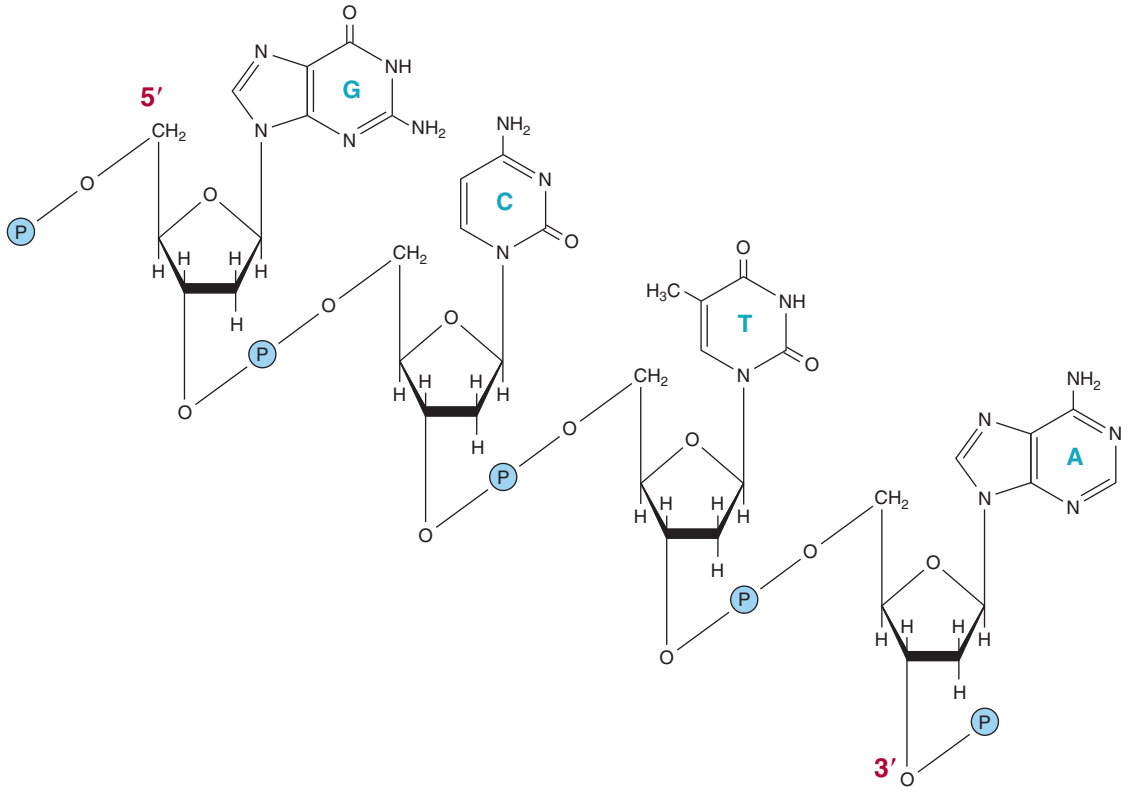


FIGURA 34-1 Um segmento de uma fita de uma molécula de DNA em que as bases purínicas e pirimidínicas guanina (G), citosina (C), timina (T) e adenina (A) são mantidas juntas por um esqueleto fosfodiéster entre as 2′-desoxirribose presas às bases nucleares por uma ligação *N*-glicosídica. Observe que o esqueleto tem polaridade (direção). A convenção estabelece que uma sequência de DNA de fita única é escrita na direção 5′– 3′ (i.e., pGpCpTpA, em que G, C, T e A representam as quatro bases e p representa os fosfatos interconectantes).

estão ordenados. O polímero, como descrito, possui uma polaridade; uma extremidade tem uma 5′-hidroxila ou fosfato terminal, enquanto a outra tem um 3′-fosfato ou hidroxila terminal. A importância dessa polaridade se tornará evidente. Uma vez que a informação genética reside na ordem das unidades monoméricas no interior dos polímeros, deve existir um mecanismo de reprodução ou replicação dessa informação específica com um alto grau de fidelidade. Essa exigência, em conjunto com dados de difração no raio X da molécula de DNA, e com a observação de Chargaff de que nas moléculas de DNA a concentração de nucleotídeos desoxiadenosina (A) é igual a de nucleotídeos de timidina (T) (A =T), enquanto a concentração de nucleotídeos de desoxiguanosina (G) é igual a de nucleotídeos de desoxicitidina (C) (G = C), levou Watson, Crick e Wilkins a propor, no início dos anos de 1950, um modelo de fita dupla da molécula de DNA. O modelo que eles propuseram está representado na **Figura 34-2**. As duas fitas dessa hélice em fita dupla são mantidas no lugar tanto por **pontes de hidrogênio** entre as bases purínicas e pirimidínicas de suas respectivas moléculas lineares quanto por **interações de van der Waals** e **interações hidrofóbicas** entre as pilhas de pares de bases adjacentes. Os pareamentos entre os nucleotídeos purínicos e pirimidínicos nas fitas opostas são muito específicos e dependentes de ligações de **A com T** e de **G com C** (Figura 34-2).

A forma comum de DNA é considerada destra, pois quando se olha para baixo da dupla-hélice, os resíduos das bases formam uma espiral no sentido horário. Na molécula de fita dupla, as restrições impostas pela rotação sobre as ligações fosfodiéster, a anticonfiguração favorecida das ligações glicosídicas (Figura 32–5) e os tautômeros predominantes (ver Figura 32–2) das quatro bases (A, G, T e C) permitem combinar A somente com T e G somente com C, conforme representado na **Figura 34-3**. Essa restrição de pareamento de bases explica a observação anterior de que em uma molécula de DNA de fita dupla, o conteúdo de A é igual ao de T e o conteúdo de G é igual ao de C.

As duas fitas da molécula de dupla-hélice, cada uma das quais com uma polaridade, são **antiparalelas**; isto é, uma fita corre na direção 5′– 3′ e a outra na direção 3′-5′. Nas moléculas de DNA de fita dupla, a informação genética reside na sequência de nucleotídeos de uma fita, a **fita-molde**. Essa é a fita de DNA que é copiada durante a síntese do **ácido ribonucleico** (**RNA**). Ela é, algumas vezes, chamada de **fita não codificante**. A fita oposta é considerada a **fita codificante**, pois corresponde à sequência do RNA transcrito (mas contendo uracila no lugar de timina; ver Figura 34-8) que codifica a proteína.

As duas fitas em que as bases opostas são mantidas juntas por pontes de hidrogênio rodeiam um eixo central na forma de uma **dupla-hélice**. Em um tubo de ensaio, o DNA de fita dupla pode existir em pelo menos seis formas (A a E e Z). A forma B é geralmente encontrada em condições fisiológicas (baixa concentração de sais, alto grau de hidratação). Uma única volta do DNA B sobre o eixo longo de uma molécula contém 10 pb. A distância

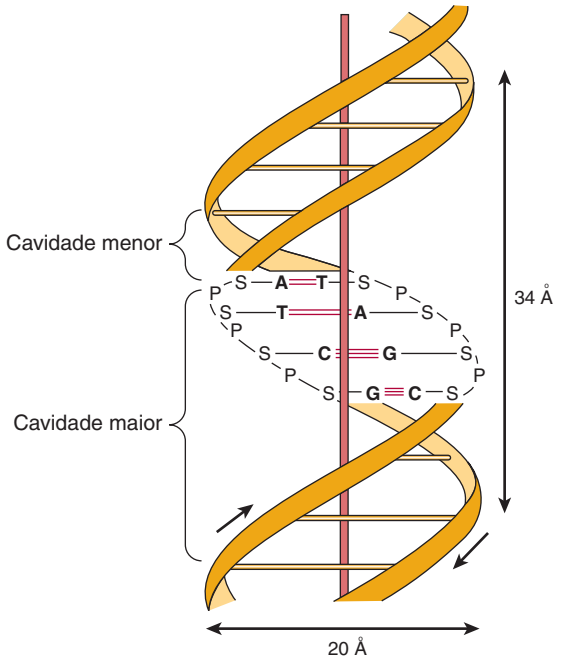


FIGURA 34-2 Uma representação diagramática do modelo de Watson e Crick da estrutura de dupa-hélice da forma B do DNA. A seta horizontal indica a largura da dupla-hélice (20 Å) e a seta vertical indica a distância alcançada por uma volta completa da dupla-hélice (34 Å). Uma volta do B-DNA inclui 10 pares de bases (pb) e, assim, a distância é de 3,4 Å por pb. O eixo central da dupla-hélice é indicado pela haste vertical. As setas pequenas designam a polaridade das fitas antiparalelas. As cavidades maior e menor são representadas (A, adenina; C, citosina; G, guanina; P, fosfato; S, açúcar [desoxirribose]; T, timina). As pontes de hidrogênio entre as bases A/T e G/C são indicadas por linhas horizontais vermelhas curtas.

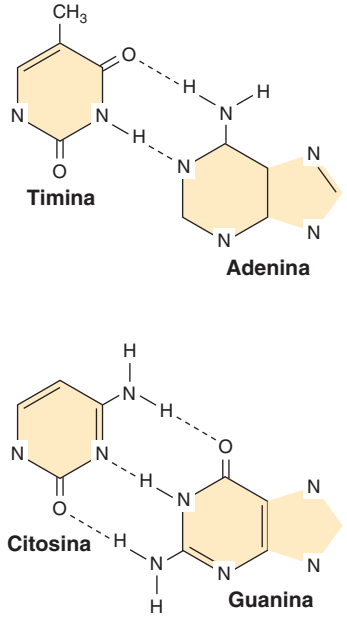


FIGURA 34-3 O pareamento de bases do DNA entre a adenina e a timina envolve a formação de duas pontes de hidrogênio. Três destas pontes se formam entre uma citosina e uma guanina. As linhas tracejadas representam as pontes de hidrogênio.

percorrida por uma volta do DNA B é de 3,4 nm (34 Å). A largura (diâmetro helicoidal) da dupla-hélice no DNA B é de 2 nm (20 Å).

Como representado na Figura 34-3, três pontes de hidrogênio, formadas por hidrogênio ligado a átomos eletronegativos N ou O, mantêm o nucleotídeo desoxiguanosina ligado ao nucleotídeo desoxicitidina, enquanto o outro par, o par A-T, é mantido junto por duas pontes de hidrogênio. Assim, as pontes de hidrogênio G-C são mais resistentes à desnaturação, ou separação da fita, um termo chamado de "fusão", do que as regiões do DNA ricas em A-T.

A desnaturação do DNA é utilizada para analisar sua estrutura

A estrutura de fita dupla do DNA pode ser separada nas duas fitas que a compõem, em solução, pelo aumento da temperatura ou diminuição da concentração de sais. Não só as duas pilhas de bases são separadas, mas as próprias bases se desempilham enquanto ainda estão ligadas no polímero pelo esqueleto de fosfodiéster. Concomitantemente a essa desnaturação da molécula de DNA, há um aumento na absorbância óptica das bases purínicas e pirimidínicas – fenômeno chamado de **hipercromicidade** da desnaturação. Devido ao empilhamento das bases e às pontes de hidrogênio entre as pilhas, a fita dupla da molécula de DNA exibe as propriedades de um bastonete rígido e, em solução, é um material viscoso que perde sua viscosidade após a desnaturação.

As fitas de determinada molécula de DNA se separam em uma certa faixa de temperatura. O ponto médio é chamado de **ponto de fusão ou T_m**. O T_m é influenciado pela composição de bases do DNA e pela concentração de sal da solução. O DNA rico em pares G-C, que apresenta três pontes de hidrogênio, se funde em uma temperatura mais elevada que o DNA rico em pares A-T, que possuem duas pontes de hidrogênio. Um aumento de 10 vezes na concentração de cátions monovalentes aumenta a T_m em 16,6°C. O solvente orgânico formamida, comumente utilizado em experimentos com DNA recombinante, desestabiliza as pontes de hidrogênio entre as bases, diminuindo, assim, a T_m. A adição de formamida permite que as fitas de DNA ou híbridos de DNA-RNA se separem em temperaturas muito mais baixas e minimiza a quebra das ligações fosfodiéster que podem ocorrer em temperaturas mais altas.

A renaturação do DNA exige pares de bases complementares

É importante ressaltar que as fitas de DNA irão se renaturar ou se reassociar quando as condições fisiológicas adequadas de temperatura e concentração de sais forem atingidas; esse processo de recombinação é frequentemente chamado de **hibridização**. A taxa de recombinação depende da concentração de fitas complementares. A recombinação das duas fitas de DNA complementares de um cromossomo após a transcrição é um exemplo fisiológico de renaturação (ver a seguir). Em uma determinada temperatura e concentração de sais, uma fita particular de ácido nucleico se associará fortemente apenas a uma fita complementar. Moléculas híbridas também se formarão em condições adequadas. Por exemplo, o DNA formará um híbrido com um DNA complementar (cDNA) ou um RNA mensageiro cognato (mRNA; ver a seguir).

Quando a hibridização é combinada com técnicas de eletroforese em gel que separam os ácidos nucleicos por tamanho, associadas a marcações de sondas radioativas ou fluorescentes, a fim de proporcionar um sinal detectável, as técnicas analíticas resultantes são chamadas de ***Southern*** **(DNA/DNA) e** ***Northern*** **(RNA–DNA)** ***blotting***, respectivamente. Esses procedimentos permitem uma identificação discriminatória de alta sensibilidade de tipos específicos de ácidos nucleicos a partir de misturas complexas de DNA ou RNA (ver Capítulo 39).

Há cavidades na molécula de DNA

O exame do modelo representado na Figura 34-2 revela uma **cavidade maior** e uma **cavidade menor** serpenteando ao longo da molécula paralelos ao esqueleto fosfodiéster. Nessas cavidades, as proteínas podem interagir especificamente com átomos expostos dos nucleotídeos (por meio de pontes salinas e hidrofóbicas específicas), desse modo, reconhecendo e se ligando a sequências de nucleotídeos específicas, bem como às formas únicas decorrentes. A ligação geralmente ocorre sem desfazer o pareamento de bases da molécula de DNA de dupla-hélice. Como discutido nos Capítulos 36 e 38, proteínas reguladoras controlam a expressão de genes específicos por meio de tais interações.

O DNA existe nas formas relaxada e super-helicoidal

Em alguns organismos, tais como bactérias, bacteriófagos, muitos vírus de animais contendo DNA, assim como organelas como a mitocôndria (ver Figura 35–8), as extremidades das moléculas de DNA são unidas para criar um círculo fechado com as terminações livres não covalentes. Isto, é claro, não destrói a polaridade das moléculas, mas elimina todos os grupos livres 3′-hidroxila, 5′-hidroxila e grupos fosforila. Círculos fechados existem nas formas relaxadas ou super-helicoidais. Super-hélices são introduzidas quando um círculo fechado é torcido em torno do seu próprio eixo, ou quando uma peça linear do DNA dúplex, cujas extremidades são fixas, é torcida. Este processo dependente de energia coloca a molécula em estresse de torção, e quanto maior o número de super-hélices, maior o estresse de torção (teste isso torcendo um elástico). **Super-hélices negativas** são formadas quando a molécula é torcida no sentido anti-horário da dupla-hélice destra encontrada no DNA B. Tal DNA é considerado desenrolado (com menos entrelaçamentos entre as duas fitas do que o normal). A energia necessária para atingir esse estágio é, de certo modo, armazenada nas super-hélices. A transição para outra forma que necessite de energia é, portanto, facilitada pelo desenrolamento (ver Figura 35–19). Uma transição desse tipo é a separação das fitas, que é um pré-requisito para a replicação e transcrição do DNA. O DNA super-helicoidal é, portanto, uma forma preferida em sistemas biológicos. Enzimas que catalisam mudanças topológicas de DNA são chamadas de **topoisomerases**. As topoisomerases podem relaxar ou inserir super-hélices, utilizando o ATP como fonte de energia. Homólogos dessas enzimas existem em todos os organismos e são alvos importantes para a quimioterapia do câncer.

O DNA FORNECE UM MOLDE PARA A REPLICAÇÃO E PARA A TRANSCRIÇÃO

A informação genética armazenada na sequência de nucleotídeos de DNA serve a dois propósitos. Ela é a fonte de informação para a síntese de todas as moléculas de proteínas das células e dos organismos, fornecendo a informação herdada pelas células-filhas ou pela prole. Ambas as funções exigem que a molécula de DNA funcione como molde – no primeiro caso, para a transcrição da informação em RNA e, no segundo caso, para a replicação da informação nas moléculas de DNA filhas.

Quando cada fita da molécula de fita dupla parental de DNA se separa de seu complementar durante a replicação, cada fita, independentemente, serve de molde no qual uma nova fita complementar é sintetizada **(Figura 34-4)**. As duas moléculas de DNA filhas de dupla-hélice recentemente formadas, cada uma contendo uma fita (complementar, mas não idêntica) da molécula do DNA parental de dupla-hélice, são então separadas entre as duas células-filhas **(Figura 34-5)**.

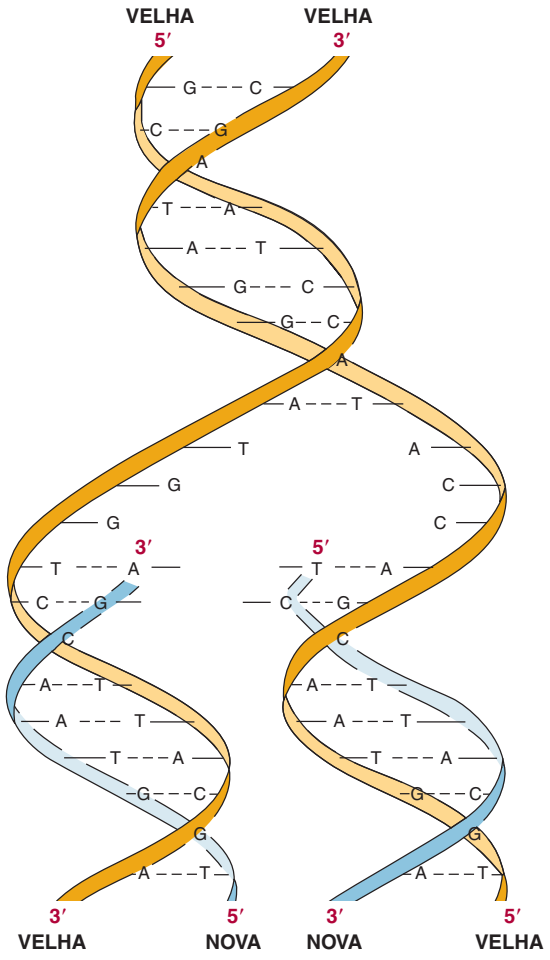


FIGURA 34-4 A estrutura de fita dupla do DNA e a função molde de cada fita velha (cor de laranja) em que uma nova fita complementar (azul) é sintetizada.

Cada célula-filha contém as moléculas de DNA com informação idêntica à que a célula parental possuía, embora em cada célula-filha a molécula de DNA da célula parental tenha sido apenas semiconservada.

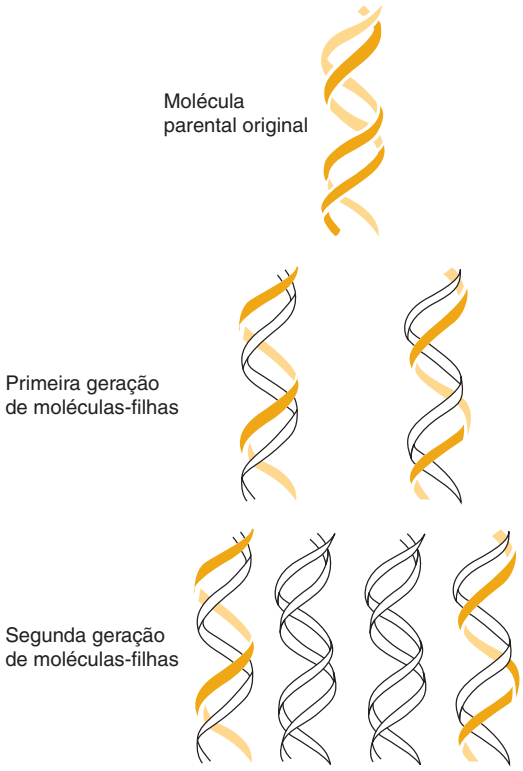


FIGURA 34-5 A replicação do DNA é semiconservativa. Durante um ciclo de replicação, cada uma das duas fitas de DNA serve de molde para a síntese de uma nova fita complementar.

A NATUREZA QUÍMICA DO RNA DIFERE DA NATUREZA QUÍMICA DO DNA

O RNA é um polímero de ribonucleotídeos de purinas e pirimidinas ligadas entre si por ligações de 3′,5′-fosfodiéster, análogas àquelas do DNA **(Figura 34-6)**. Apesar de compartilhar muitas características com o DNA, o RNA tem várias diferenças específicas:

1. No RNA, o açúcar em que os fosfatos e as bases purínicas e pirimidínicas estão presas é uma ribose, em vez da 2′-desoxirribose do DNA.
2. Os componentes de pirimidina do RNA podem ser diferentes daqueles do DNA. Embora o RNA contenha os ribonucleotídeos de adenina, guanina e citosina, ele não tem timina, exceto nos raros casos mencionados adiante. Em vez de timina, o RNA contém o ribonucleotídeo uracila.
3. O RNA geralmente existe como fita única, enquanto o DNA existe como uma molécula helicoidal de fita dupla. Entretanto, a partir da sequência de bases complementares adequada, com polaridade oposta, a fita única de RNA –

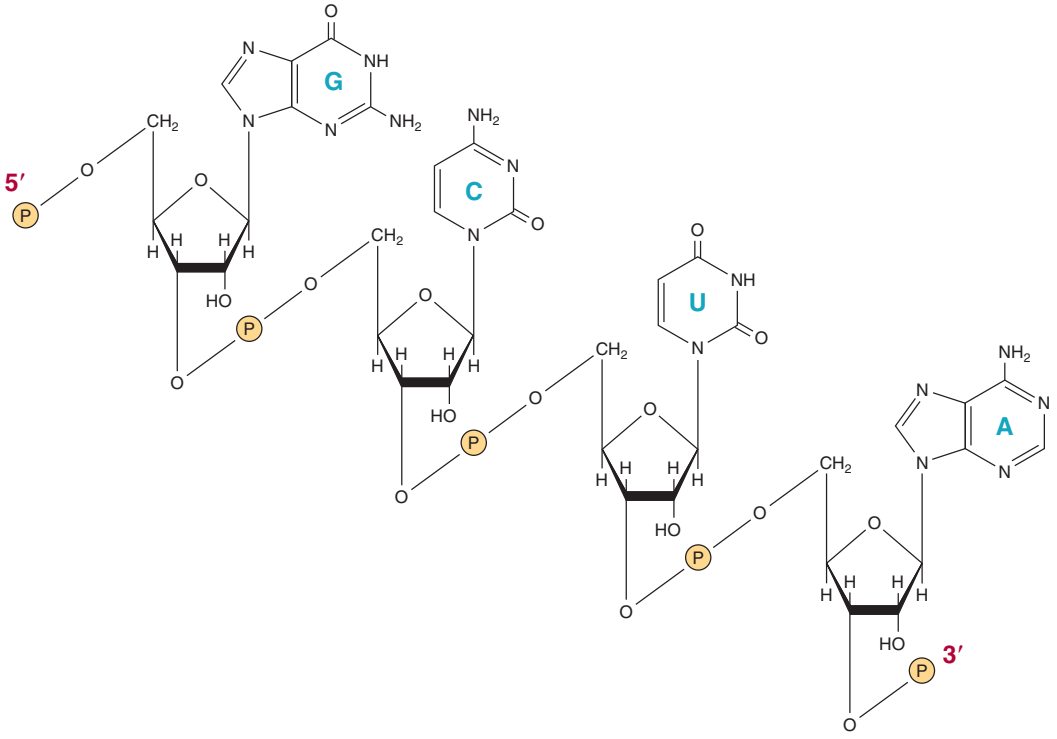


FIGURA 34-6 Um segmento da molécula de ácido ribonucleico (RNA) em que as bases purínicas e pirimidínicas – guanina (G), citosina (C), uracila (U) e adenina (A) – são mantidas juntas por ligações fosfodiéster entre as riboses presas às bases nucleares por ligações *N*-glicosídicas. Observe que o polímero tem uma polaridade, como indicado pelos fosfatos ligados marcados 3′ e 5′.

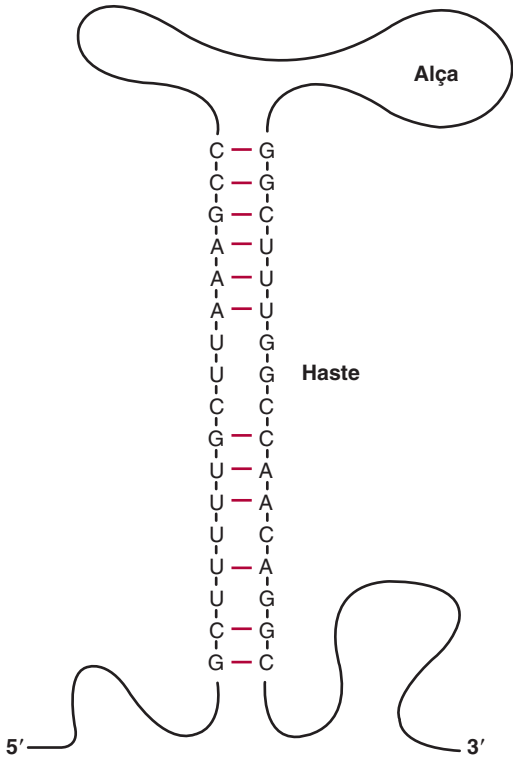


FIGURA 34-7 Representação diagramática da estrutura secundária de uma molécula de fita única de RNA na qual um *stem loop*, ou "grampo de cabelo", se formou. A formação desta estrutura depende do pareamento de bases intramoleculares indicadas (linhas horizontais coloridas entre as bases). Observe que A forma ligações de hidrogênio com U no RNA.

como demonstrado na **Figura 34-7** e na Figura 34-11 – é capaz de se dobrar para trás sobre si mesma, como um grampo de cabelo, adquirindo então as características de fita dupla: G pareado com C e A com U.

4. Uma vez que a molécula de RNA é uma fita única complementar a apenas uma ou duas fitas de um gene, seu conteúdo de guanina não é necessariamente igual ao seu conteúdo de citosina, assim como o seu teor de adenina não é necessariamente igual ao seu teor de uracila.
5. A molécula de RNA pode ser hidrolisada por bases em 2′,3′-diésteres cíclicos de mononucleotídeos, compostos que não podem ser formados a partir do DNA tratado com bases devido à ausência do grupo 2′-hidroxila. A labilidade às bases do RNA é útil tanto para o diagnóstico quanto para a análise. A informação dentro de uma única fita de RNA está contida em sua sequência ("estrutura primária") de nucleotídeos de purina e pirimidina no interior do polímero. A sequência é complementar à fita-molde do gene a partir da qual ela foi transcrita. Devido a essa complementaridade, uma molécula de RNA pode se ligar especificamente por regras de pareamento das bases à sua fita molde de DNA (**A**–T, **G**–C, **C**–G, **U**–A; bases de RNA em negrito); ela não irá se ligar ("hibridizar") com a outra (codificadora) fita do seu gene. A sequência da molécula de RNA (exceto para U no lugar de T) é a mesma da fita que codifica o gene **(Figura 34-8)**.

Quase todas as diversas espécies de RNA abundantes e estáveis estão envolvidas em algum aspecto da síntese de proteínas

Aquelas moléculas citoplasmáticas de RNA que funcionam como modelos para a síntese de proteínas (isto é, que transferem informação genética do DNA para um maquinário sintetizador de proteínas) são designadas **mRNAs**. Muitas outras moléculas de RNA citoplasmáticas abundantes (**RNA ribossomais; rRNA**) têm funções estruturais em que contribuem para a formação e função dos ribossomos (a organela maquinário para a síntese de proteínas) ou funcionam como moléculas adaptadoras (**RNA de transferência; tRNA**) para a tradução da informação do RNA em sequências específicas de aminoácidos polimerizados.

Curiosamente, algumas moléculas de RNA possuem atividade catalítica intrínseca. A atividade dessas **ribozimas** frequentemente envolve a clivagem de um ácido nucleico. Duas enzimas de RNA bem estudadas, ou ribozimas, são a peptidiltransferase, que catalisa a formação de ligações de peptídeos no ribossomo, e ribozimas envolvidas no *splicing* de RNA.

Em todas as células eucarióticas, há espécies de **pequenos RNA nucleares** (**snRNA**) que não estão diretamente envolvidas com a síntese de proteínas, mas desempenham um papel central no processamento do RNA. Essas moléculas relativamente pequenas variam em tamanho de 90 a cerca de 300 nucleotídeos **(Tabela 34-1)**. As propriedades das diversas classes de RNA celulares são detalhadas a seguir.

O material genético de alguns vírus de animais e plantas é o RNA em vez de DNA. Embora alguns vírus de RNA nunca tenham suas informações transcritas para uma molécula de DNA, muitos vírus de RNA animais – especificamente, os retrovírus (p. ex., o vírus HIV) – são transcritos por **DNA-polimerase depende de RNA viral, a chamada transcriptase reversa**, para

FIGURA 34-8 A relação entre as sequências de um transcrito de RNA e seu gene, no qual as fitas codificadora e molde são mostradas com suas polaridades. O transcrito de RNA com uma polaridade 5′ para 3′ é complementar à fita-molde com sua polaridade 3′ para 5′. Observe que a sequência no transcrito de RNA e sua polaridade são as mesmas que na fita codificadora, exceto que o U no transcrito substitui o T do gene; o nucleotídeo iniciador dos RNAs contém um 5′-trifosfato terminal (i.e., pppA-acima).

TABELA 34-1 Algumas espécies de RNA estáveis pequenos encontrados em células de mamíferos

Nome	Comprimento (nucleotídeos)	Moléculas por célula	Localização
U1	165	1×10^6	Nucleoplasma
U2	188	5×10^5	Nucleoplasma
U3	216	3×10^5	Nucléolo
U4	139	1×10^5	Nucleoplasma
U5	118	2×10^5	Nucleoplasma
U6	106	3×10^5	Grânulos de pericromatina
4,5S	95	3×10^5	Núcleo e citoplasma
7SK	280	5×10^5	Núcleo e citoplasma

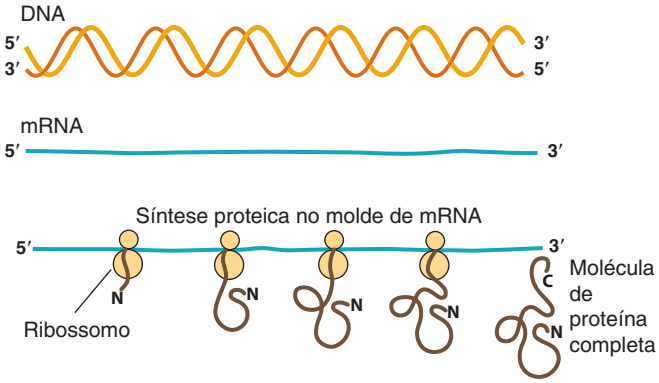


FIGURA 34-9 A expressão da informação genética do DNA na forma de um mRNA transcrito com polaridade 5′-3′ é apresentada. O mRNA é posteriormente traduzido pelos ribossomos em uma molécula específica de proteína que também exibe uma polaridade N-terminal (**N**) para C-terminal (**C**).

produzir uma cópia de fita dupla de DNA de seu genoma de RNA. Em muitos casos, a transcrição resultante da fita dupla de DNA é integrada ao genoma do hospedeiro e posteriormente funciona como um modelo para a expressão gênica a partir da qual novos genomas de RNA e mRNA virais podem ser transcritos. A inserção genômica dessas moléculas de DNA "proviral" integrantes pode, dependendo do local envolvido, ser mutagênica, inativando um gene ou desregulando a sua expressão (ver Figura 35–11).

Existem várias classes diferentes de RNA

Em todos os organismos procariotos e eucariotos, existem quatro classes principais de moléculas de RNA: mRNA, rRNA, tRNA, e RNA pequenos. Cada uma difere das outras pela quantidade, pelo tamanho, pela função e pela estabilidade geral.

RNA mensageiro

Esta classe é a mais heterogênea em quantidade, tamanho e estabilidade; por exemplo, na levedura da cerveja, os mRNA específicos estão presentes em 100s/célula para, em média, $\leq$ 0,1/mRNA/célula em uma população geneticamente homogênea. Como detalhado nos Capítulos 36 e 38, ambos os mecanismos específicos de transcrição e pós-transcrição contribuem para essa grande faixa dinâmica em conteúdo de mRNA. Em células de mamíferos, a quantidade de mRNA provavelmente varia em uma faixa maior que 10^4 vezes. Todos os membros da classe funcionam como mensageiros que transportam a informação de um gene para o maquinário sintetizador de proteínas, onde cada mRNA funciona como um modelo em que uma sequência específica de aminoácidos é polimerizada para formar uma molécula de proteína específica, o último produto do gene **(Figura 34-9)**.

Os mRNAs eucarióticos têm características químicas únicas. O terminal 5′ do mRNA é "coberto por um capuz" de trifosfato de 7-metilguanosina, que está ligado a um 2′-*O*-metil ribonucleosídeo adjacente na sua porção 5′ por meio de três fosfatos **(Figura 34-10)**. As moléculas de mRNA frequentemente contêm 6-metiladenilatos internos e outros nucleotídeos 2′-*O*-ribose-metilados. O capuz está envolvido no reconhecimento do mRNA pela maquinaria de síntese de tradução, e também ajuda a estabilizá-lo, evitando o ataque de 5′-exonucleases. A maquinaria de síntese de proteínas começa a tradução do mRNA em proteínas, começando do terminal 5′, ou quepe terminal, e seguindo molécula abaixo. A outra extremidade das moléculas de mRNA, o terminal 3′-hidroxila, tem preso um polímero de resíduos de adenilato de 20 a 250 nucleotídeos de comprimento, não codificado geneticamente. A "cauda" poli (A) no terminal 3′-hidroxila dos mRNA mantém a estabilidade intracelular dos mRNAs específicos, evitando o ataque de 3′-exonucleases e também facilitando a tradução (Figura 37–7). Alguns mRNAs, incluindo aqueles para algumas histonas, não contêm uma cauda poli (A). Tanto o "capuz" do mRNA quanto a "cauda de poli(A)" são adicionados pós-transcricionalmente por enzimas diretas, sem modelos, às moléculas precursoras de mRNA (pré-mRNA). O mRNA representa 2 a 5% do total de RNA celular de eucariotos.

Em células de mamíferos, incluindo as células humanas, as moléculas de mRNA presentes no citoplasma não são os produtos de RNA imediatamente sintetizados a partir de um modelo de DNA, mas devem ser formados por processamento a partir de pré-mRNA antes de penetrar no citoplasma. Assim, em núcleos de mamíferos, os produtos imediatos da transcrição do gene (transcritos primários) são muito heterogêneos, e podem ser de 10 a 50 vezes maiores que as moléculas de mRNA maduras. Como discutido no Capítulo 36, as moléculas de pré-mRNA são processadas para gerar as moléculas de mRNA que, então, entram no citoplasma para atuar como modelos para a síntese de proteínas.

RNA transportador

As moléculas de tRNA variam em comprimento de 74 a 95 nucleotídeos. Elas também são geradas por processamento nuclear de uma molécula precursora (Capítulo 36). As moléculas de tRNA funcionam como adaptadores para a tradução da informação na sequência de nucleotídeos do mRNA para aminoácidos

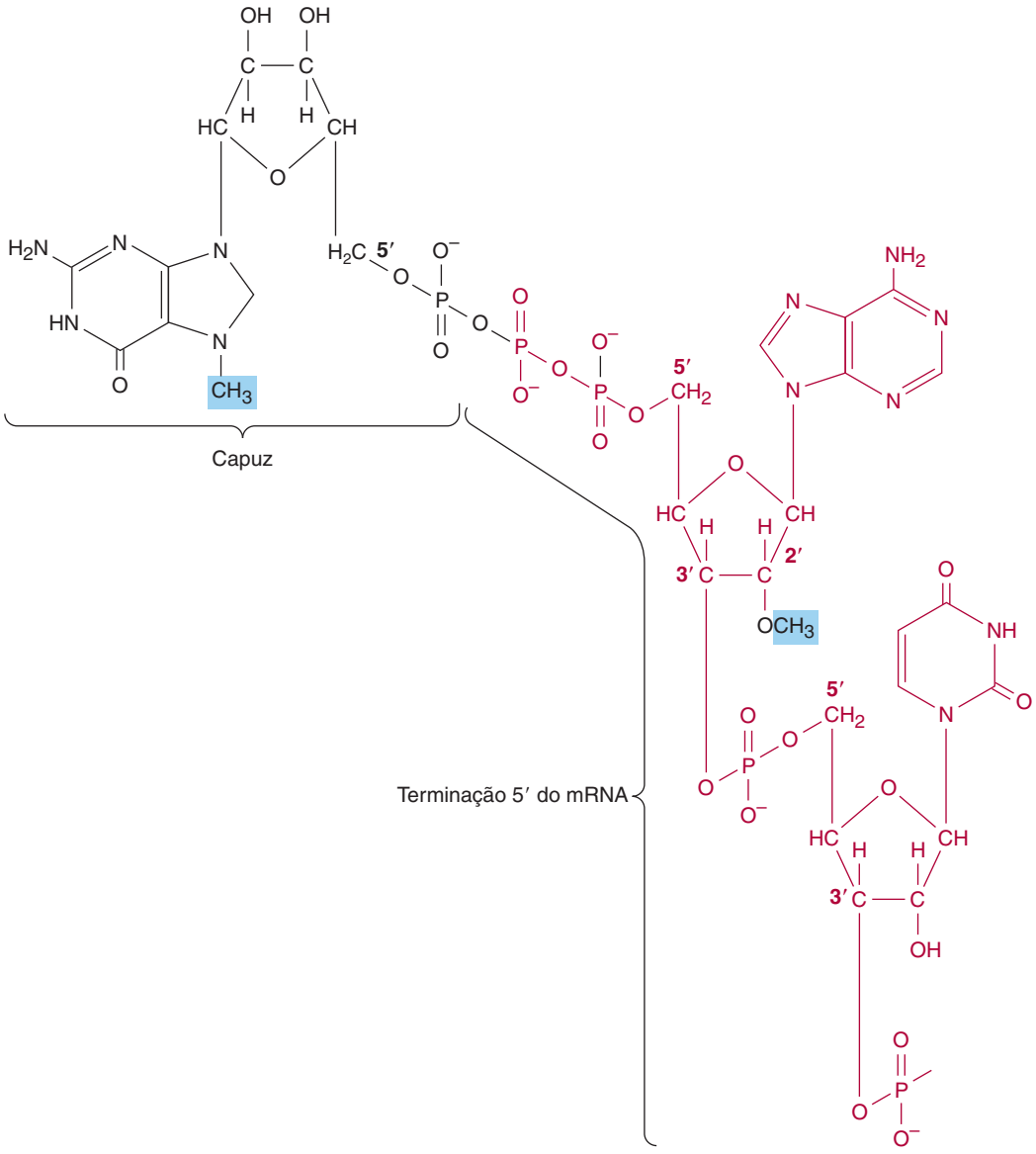


FIGURA 34-10 A estrutura da cobertura presa ao terminal 5′ da maioria das moléculas de mRNA de eucariotos. Um trifosfato de 7-metilguanosina (preto) está preso ao terminal 5′ do mRNA (colorido), que, em geral, também contém um nucleotídeo 2′-*O*-metilpurina. Estas modificações (a cobertura e o grupo metil) são adicionadas após o mRNA ser transcrito a partir do DNA.

específicos. Há, pelo menos, 20 espécies de moléculas de tRNA em cada célula, pelo menos uma (e, frequentemente várias) corresponde a cada um dos 20 aminoácidos necessários para a síntese de proteínas. Embora cada tRNA específico seja diferente dos demais, em sua sequência de nucleotídeos as moléculas de tRNA, como uma classe, têm muitas características em comum. A estrutura primária – isto é, a sequência de nucleotídeos – de todas as moléculas de tRNA permite o dobramento extenso e a complementariedade entre as fitas para gerar uma estrutura secundária que aparece em duas dimensões, como uma folha de trevo (**Figura 34-11**).

Todas as moléculas de tRNA contêm quatro braços principais. O **braço aceptor** termina nos nucleotídeos CpCpAOH. Estes três nucleotídeos são adicionados pós-transcricionalmente por uma enzima nucleotidiltransferase específica. O aminoácido adequado ao tRNA é ligado, ou "carregado" para o grupo 3′-OH da parte A do braço aceptor (ver Figura 37–1). Os **D**, **TψC** e **braços extras** ajudam a definir um tRNA específico. Os tRNAs compõem cerca de 20% do RNA celular total.

RNA ribossomal

Um ribossomo é uma estrutura de nucleoproteína citoplasmática que atua como a maquinaria para a síntese de proteínas a partir de modelos de mRNA. Nos ribossomos, as moléculas de mRNA e tRNA interagem para traduzir-se em uma molécula específica de proteína informação transcrita de um gene. Nos períodos de síntese proteica ativa, muitos ribossomos podem ser associados a qualquer molécula de mRNA para formar um conjunto chamado de **polissomo** (Figura 37–7).

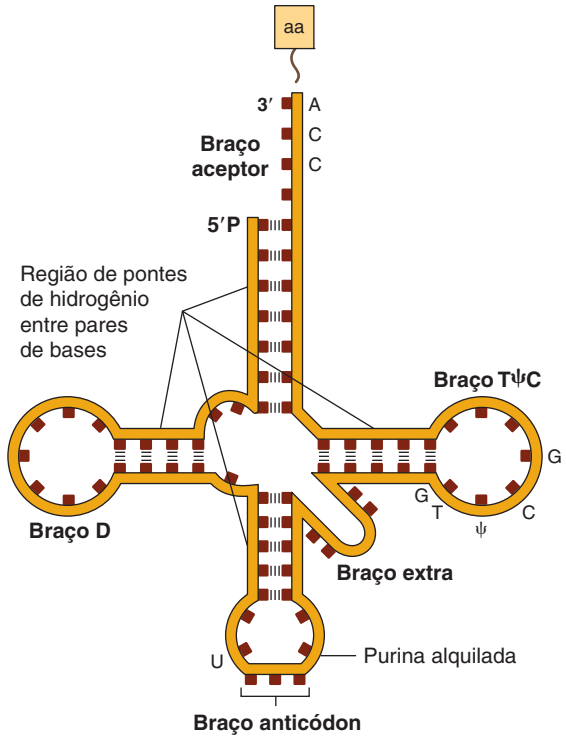


FIGURA 34-11 Típico tRNA aminoacil em que o aminoácido (AA) é ligado à terminação 3′ CCA. O anticódon, TψC e os braços de di-hidrouracila são indicados, bem como as posições das pontes de hidrogênio intramoleculares entre esses pares de bases. ψ é uma pseudouridina, um isômero de uridina formada pós-transcricionalmente. (Watson JD, et al, *Molecular Biology of the Gene,* 6th Edition, c 2008,p. 243. Adaptada com a permissão de Pearson Education, Inc., UpperSaddle River, New Jersey, EUA).

Os componentes dos ribossomos de mamíferos, que têm peso molecular de cerca de $4{,}2 \times 10^6$ e coeficiente de velocidade de sedimentação de 80S (S= unidades Svedberg, parâmetro sensível ao tamanho e à forma molecular), são mostrados na **Tabela 34-2**. O ribossomo de mamíferos contém duas subunidades principais de nucleotídeos – uma maior, com um peso molecular de $2{,}8 \times 10^6$ (60S) e uma subunidade menor, com peso molecular de $1{,}4 \times 10^6$ (40S). A subunidade 60S contém um rRNA de 5S, um rRNA de 5,8S e um rRNA de 28S; há também mais de 50 polipeptídeos específicos. A subunidade 40S é menor e contém um único rRNA de 18S e, aproximadamente, 30 cadeias de polipeptídeos diferentes. Todas as moléculas de rRNA, exceto o rRNA 5S, que é transcrito independentemente, são processadas a partir de uma única molécula precursora de RNA de 45S, no nucléolo (Capítulo 36). As moléculas de rRNA altamente metiladas são acondicionadas no nucléolo com proteínas ribossomais específicas. No citoplasma, os ribossomos permanecem bastante estáveis e capazes de realizar vários ciclos de tradução. As funções exatas das moléculas de rRNA na partícula ribossomal não são completamente compreendidas, mas são necessárias para a montagem ribossomal e também desempenham papéis fundamentais na ligação dos mRNA aos ribossomos e na sua tradução. Estudos recentes indicam que o componente maior de rRNA desempenha a atividade de peptidiltransferase e, portanto, é uma ribozima. Os rRNA (28S + 18S) representam cerca de 70% do total de RNA celular.

RNA pequeno

Um grande número de RNA pequenos, discretos e altamente conservados é encontrado nas células eucarióticas; alguns são bastante estáveis. A maior parte dessas moléculas está complexada com proteínas para formar as ribonucleoproteínas e distribuída no núcleo, no citoplasma ou em ambos. Elas variam em tamanho de 20 a 1.000 nucleotídeos e estão presentes em 100.000 a 1.000.000 de cópias por célula, representando coletivamente $\leq$ 5% do RNA celular.

Pequenos RNA nucleares

Os RNAsn, um subconjunto de pequenos RNAs (Tabela 34-1), estão significativamente envolvidos no processamento do rRNA e do mRNA e na regulação gênica. Dos diversos snRNAs, os U1, U2, U4, U5 e U6 estão envolvidos na remoção de íntrons e no processamento de precursores de mRNA em mRNA (Capítulo 36). O snRNA U7 está envolvido na produção da extremidade 3′ correta da histona do mRNA – sem uma cauda poli(A). O RNA 7SK se associa a várias proteínas para formar um complexo de ribonucleoproteína, denominado P-TEFb, que modula o alongamento da transcrição do gene do mRNA pela RNA-polimerase II (ver Capítulo 36).

MicroRNAs, miRNAs e pequenos RNAs interferentes, siRNAs, e RNAs não codificadores

Uma das descobertas mais interessantes e imprevisíveis da última década na biologia da regulação dos eucariotos, foi a identificação e caracterização dos miRNA, uma classe de pequenos RNAs

TABELA 34-2 Componentes dos ribossomos de mamíferos

		Proteína		RNA		
Componente	**Massa (MW)**	**Número**	**Massa**	**Tamanho**	**Massa**	**Bases**
Subunidade 40S	$1{,}4 \times 10^6$	33	7×10^5	18S	7×10^5	1900
Subunidade 60S	$2{,}8 \times 10^6$	50	1×10^6	5S	3.5×10^4	120
				5,8S	4.5×10^4	160
				28S	1.6×10^6	4700

Nota: As subunidades ribossomais estão definidas de acordo com a velocidade de sedimentação em unidades Svedberg (**S**; 405 ou 605). Estão listadas o número de proteínas únicas e suas massas totais (MW), os componentes de RNA de cada subunidade em tamanho (unidade Svedberg), a massa e o número de bases.

encontrada na maioria dos eucariotos (Capítulo 38). Quase todos os **miRNA** e **siRNA** conhecidos **provocam a inibição da expressão gênica** por meio da diminuição da produção de proteína específica, embora por mecanismos distintos. Os miRNA têm geralmente de 21 a 25 nucleotídeos de comprimento e são gerados por processamento nucleolítico dos produtos de genes distintos/unidades de transcrição (ver Figura 37–16). Os precursores de miRNA são de fita única, mas possuem extensa estrutura intramolecular secundária. Estes precursores variam em tamanho de cerca de 500 a 1.000 nucleotídeos; os **miRNA** pequenos processados maduros **geralmente hibridizam por meio da formação de dúplexes imperfeitos de RNA-RNA no interior das regiões 3′ não traduzidas** (3′UTRs; ver Figura 38–19) de mRNAs alvo específicos, levando, **por mecanismos pouco conhecidos, à suspensão da tradução.** Até o momento, centenas de miRNA diferentes já foram descritos em humanos; estimativas sugerem que existam cerca de 1.000 genes humanos codificadores de miRNA. Tal como acontece com os miRNAs, os siRNAs também são derivados da clivagem específica nucleolítica de RNA maiores, para novamente formarem produtos pequenos de 21 a 25 nucleotídeos de comprimento. Esses **siRNAs curtos geralmente formam híbridos perfeitos de RNA-RNA** com seus alvos distintos potencialmente em qualquer local no interior do comprimento do mRNA onde exista a sequência complementar. A formação de tais dúplexes RNA-RNA entre o siRNA e o mRNA resulta na redução da produção de proteína específica, porque os **complexos siRNA-mRNA são degradados** pelo maquinário nucleolítico; alguma ou a totalidade da degradação de mRNA ocorre em organelas citoplasmáticas específicas, denominadas **corpos P** (Figura 37–11). Devido à sua sofisticada especificidade gênica, ambos os miRNA e os siRNAs representam novos **agentes potenciais interessantes para o desenvolvimento de fármacos terapêuticos**. Além disso, os siRNAs são frequentemente utilizados para diminuir ou "desligar" os níveis de proteínas específicas (por meio da degradação de mRNA direcionada por homólogos de siRNA) em contextos experimentais no laboratório, uma alternativa extremamente útil e poderosa à tecnologia de *knockout* gênico. Outra descoberta recente interessante no âmbito do RNA é a identificação e a caracterização de **RNA não codificantes longos**, ou ncRNA. Os ncRNAs longos, como seu nome sugere, não codificam proteínas com variações de tamanho entre 300 e 1.000 nucleotídeos de comprimento. Esses RNAs são geralmente transcritos a partir de grandes regiões do genoma de eucariotos que não codificam proteínas. De fato, análises de transcriptomas, por meio da nova geração de tecnologia de sequenciamento (ver Capítulo 39), indicam que **mais de 90% de todo DNA genômico eucariótico é transcrito**. Os ncRNAs compõem uma parcela significativa dessa transcrição. Os ncRNAs desempenham muitas funções, que vão desde a contribuição para aspectos estruturais da cromatina à regulação da transcrição do gene de mRNA pela RNA-polimerase II. Trabalhos futuros irão caracterizar ainda mais essa nova classe importante de moléculas de RNA.

Curiosamente, as bactérias também contêm RNA reguladores, pequenos e heterogêneos, chamados de sRNAs. Os sRNAs bacterianos variam em tamanho de 50 a 500 nucleotídeos e, como os mi/siRNA de eucariotos, também controlam uma grande variedade de genes. Os sRNAs frequentemente reprimem, mas algumas vezes ativam, a síntese proteica, por meio da ligação a mRNAs específicos.

NUCLEASES ESPECÍFICAS DIGEREM OS ÁCIDOS NUCLEICOS

As enzimas capazes de degradar os ácidos nucleicos foram identificadas há muitos anos. Estas nucleases podem ser classificadas de vários modos. Aquelas que exibem especificidade para o DNA são chamadas de **desoxirribonucleases**. Aquelas que especificamente hidrolisam o RNA são as **ribonucleases**. Algumas nucleases degradam tanto o DNA quanto o RNA. No interior de ambas as classes, as enzimas são capazes de clivar as ligações fosfodiéster internas para produzir tanto as terminações 3′-hidroxila e 5′-fosforila quanto as extremidades 5′-hidroxila e 3′-fosforila. Elas são chamadas de **endonucleases**. Algumas são capazes de hidrolisar ambas as fitas de uma molécula de **fita dupla**, enquanto outras podem apenas clivar **fitas simples** de ácidos nucleicos. Algumas nucleases podem hidrolisar apenas fitas simples não pareadas, enquanto outras são capazes de hidrolisar fitas simples que participam na formação de uma molécula de fita dupla. Há classes de endonucleases que reconhecem sequências específicas no DNA; a maior parte delas é de **endonuclases de restrição,** que nos últimos anos se tornaram ferramentas importantes na genética molecular e nas ciências médicas. Uma lista com algumas das endonucleases de restrição, atualmente reconhecidas, é apresentada na Tabela 39–2.

Algumas nucleases são capazes de hidrolisar um nucleotídeo apenas quando ele está presente na extremidade de uma molécula; elas são chamadas de **exonucleases**. As exonucleases atuam em uma direção (3′ → 5′ ou 5′ → 3′) apenas. Em bactérias, uma exonuclease 3′ → 5′ é uma parte integrante da maquinaria de replicação do DNA e lá funciona para editar – ou revisar – os erros no pareamento das bases adicionadas mais recentemente ao desoxinucleotídeo.

RESUMO

- O DNA consiste em quatro bases – A, G, C e T – mantidas em um arranjo linear por ligações fosfodiéster, por meio das posições 3′ e 5′ de desoxirriboses adjacentes.
- O DNA está organizado em duas fitas pelo pareamento de bases A com T e G com C de fitas complementares. Essas fitas formam uma dupla-hélice em volta de um eixo central.
- Os 3×10^9 pb de DNA em humanos estão organizados em um complemento haploide de 23 cromossomos. A sequência exata desses 3 bilhões de nucleotídeos define a singularidade de cada indivíduo.
- O DNA fornece um modelo para sua própria replicação e, portanto, para a manutenção do genótipo e para a transcrição de cerca de 25.000 genes codificadores de proteínas humanas, bem como para uma grande matriz de RNA reguladores que não codificam proteínas.
- O RNA existe em várias estruturas de fitas simples diferentes, a maior parte delas direta ou indiretamente envolvidas na síntese proteica ou sua regulação. O arranjo linear de nucleotídeos no RNA consiste em A, G, C e U, sendo o açúcar a ribose.
- As principais formas de RNA incluem mRNA, rRNA, tRNA, e snRNA (miRNA). Certas moléculas de RNA agem como catalisadores (ribozimas).

REFERÊNCIAS

Chapman EJ, Carrington JC: Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. Nature Rev Genetics 2007;8:884.

Costa FF: Non-coding RNAs: meet thy masters. Bioessays 2010;32:599–608.

Dunkle JA, Cate JH: Ribosome structure and dynamics during translation. Annu Rev Biophys 2010;39:227–244.

Green R, Noller HF: Ribosomes and translation. Annu Rev Biochem 1997;66:689.

Guthrie C, Patterson B: Spliceosomal snRNAs. Ann Rev Genet 1988;22:387.

Keene JD: Minireview: global regulation and dynamics of ribonucleic acid. Endocrinology 2010;151: 1391–1397.

Loewer S, Cabili MN, Guttman M, et al: Large intergenic non-coding RNA–RoR modulates reprogramming of human induced pluripotent stem cells. Nat Genet 2010;42:113–1137.

Moore M: From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. Science 2005;309:1514.

Narla A, Ebert BL: Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. Blood 2010;115:3196–3205.

Phizicky EM, Hopper AK: tRNA biology charges to the front. Genes Devlop 2010;24:1832–1860.

Wang G-S, Cooper TA: Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. Nature Rev Genetics 2007;8:749.

Watson JD, Crick FHC: Molecular structure of nucleic acids. Nature 1953;171:737.

Watson JD: *The Double Helix.* Atheneum, 1968.

Watson JD, Baker TA, Bell SP, et al: *Molecular Biology of the Gene,* 6th ed. Benjamin-Cummings, 2007.

CAPÍTULO

35

Organização, Replicação e Reparo do DNA

P. Anthony Weil, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Observar que os cerca de 3×10^9 de pares de bases de DNA que compõem o genoma humano haploide são divididos singularmente entre 23 unidades de DNA lineares, os cromossomos. Humanos, sendo diploides, têm 23 pares de cromossomos: 22 autossômicos e 2 cromossomos sexuais.
- Compreender que o DNA do genoma humano, se estendido de ponta a ponta, teria metros de comprimento, mas ainda assim cabe no interior do núcleo da célula, uma organela que tem apenas mícrons (μ; 10^{-6} metros) de diâmetro. Tal condensação no comprimento do DNA é induzida após a sua associação com histonas, proteínas altamente carregadas positivamente, resultando na formação de um complexo DNA-histona único, denominado nucleossomo. Os nucleossomos contêm DNA enrolado em volta da superfície de um octâmero de histonas.
- Explicar que as cadeias de nucleossomos se formam ao longo de sequências lineares de DNA genômico para formar a cromatina que, por si só, pode ser mais fortemente embalada e condensada, o que, em última análise, leva à formação dos cromossomos.
- Reconhecer que enquanto os cromossomos são as unidades funcionais macroscópicas para a recombinação do DNA, ordenação dos genes e divisão celular, essas são funções do DNA, no nível dos nucleotídeos individuais, que compõem as sequências reguladoras ligadas a genes específicos, que são essenciais para a vida.
- Elucidar os estágios, as fases do ciclo celular e as moléculas responsáveis pela replicação, pelo reparo e pela recombinação do DNA, e compreender os efeitos negativos de erros em qualquer um desses processos sobre a integridade e saúde celular e do organismo.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA*

A informação genética no DNA de um cromossomo pode ser transmitida por replicação exata ou pode ser trocada por meio de diversos processos, incluindo *crossing over*, recombinação, transposição e conversão. Eles fornecem um meio de garantir adaptabilidade e diversidade ao organismo, mas quando esses processos são alterados, doenças podem surgir. Diversos sistemas enzimáticos estão envolvidos na replicação, na alteração e no reparo do DNA.

As mutações se devem a uma mudança nas sequências de bases do DNA e podem resultar em uma replicação errônea, movimento ou reparo do DNA, e ocorrer com uma frequência de cerca de uma em cada 10^6 divisões celulares. Os defeitos em produtos de genes (seja no RNA, na função das proteínas ou na quantidade) podem ser o resultado de mutações que ocorrem na codificação ou na região reguladora do DNA. Uma mutação em uma célula germinativa é transmitida para a prole (a chamada transmissão vertical de doença hereditária). Diversos fatores, incluindo vírus, substâncias químicas, raios ultravioleta e radiação ionizante, aumentam a taxa de mutação. As mutações frequentemente afetam as células somáticas, e, assim, são transmitidas às gerações sucessivas de células, mas apenas no interior de um

* Na medida do possível, a discussão neste capítulo e nos Capítulos 36, 37 e 38 será sobre mamíferos que, é claro, estão entre os eucariotos superiores. Às vezes será necessário fazer referência a observações em organismos procariotos, como bactérias e vírus, ou sistemas de modelos de eucariontes inferiores, como *Drosophila*, *C. elegans* ou leveduras. Entretanto, nesses casos, a informação será de um tipo capaz de ser extrapolada para mamíferos.

organismo (i.e., horizontalmente). Torna-se evidente que várias doenças – e provavelmente a maioria dos cânceres – se devem aos efeitos combinados de transmissão vertical de mutações, bem como transmissão horizontal de mutações induzidas.

A CROMATINA É O MATERIAL CROMOSSÔMICO NOS NÚCLEOS DAS CÉLULAS DE ORGANISMOS EUCARIÓTICOS

A cromatina consiste em **moléculas de DNA** de fita dupla muito longas (**dsDNA**) e uma massa aproximadamente igual de proteínas básicas muito pequenas chamadas de **histonas**, bem como uma quantidade menor de **proteínas não histonas** (a maior parte das quais são ácidas e maiores do que as histonas) e uma pequena quantidade de **RNA**. As proteínas não histonas incluem enzimas envolvidas na replicação e no reparo do DNA e as proteínas envolvidas na síntese, no processamento e no transporte de RNA para o citoplasma. A hélice do dsDNA em cada cromossomo tem um comprimento que é milhares de vezes o tamanho do diâmetro do núcleo da célula. Um dos objetivos das moléculas que compõem a cromatina, particularmente as histonas, é o de condensar o DNA; entretanto, é importante observar que as histonas também participam integralmente da regulação dos genes (Capítulos 36, 38 e 42); de fato, as histonas contribuem, de forma importante, para a totalidade das operações moleculares direcionadas pelo DNA. Estudos de microscopia eletrônica da cromatina mostraram a presença de partículas esféricas densas, chamadas de **nucleossomos**, com aproximadamente 10 nm de diâmetro e conectadas por filamentos de DNA (**Figura 35-1**). Os nucleossomos são compostos de emaranhados de DNA em volta de um conjunto de moléculas de histona.

As histonas são as proteínas mais abundantes da cromatina

As histonas são uma pequena família de proteínas básicas estreitamente relacionadas. As **histonas H1** são as que se ligam menos fortemente à cromatina (**Figuras 35-1, 35-2 e 35-3**) e são, portanto, facilmente removidas com uma solução salina, após a qual, a cromatina se torna mais solúvel. A unidade organizacional dessa cromatina solúvel é o nucleossomo. **Os nucleossomos contêm quatro tipos principais de histonas**: **H2A**, **H2B**, **H3** e **H4**. As estruturas de todas as quatro histonas – H2A, H2B, H3 e H4, as chamadas histonas nucleares que formam o nucleossomo – têm sido altamente conservadas entre as espécies, embora variantes dessas histonas existam e sejam utilizadas com fins especializados. Essa conservação extrema indica que a função das histonas é idêntica em todos os eucariotos, e que a molécula inteira está envolvida muito especificamente no exercício dessas funções. O terminal carboxila de dois terços das moléculas de histona é hidrofóbico, enquanto o terminal amina de um terço das moléculas é particularmente rico em aminoácidos básicos. **Essas quatro histonas nucleares estão sujeitas a, pelo menos, seis tipos de modificações covalentes ou pós-tradução** (**PTMs**): acetilação, metilação, fosforilação, ADP-ribolização, monoubiquitinação e

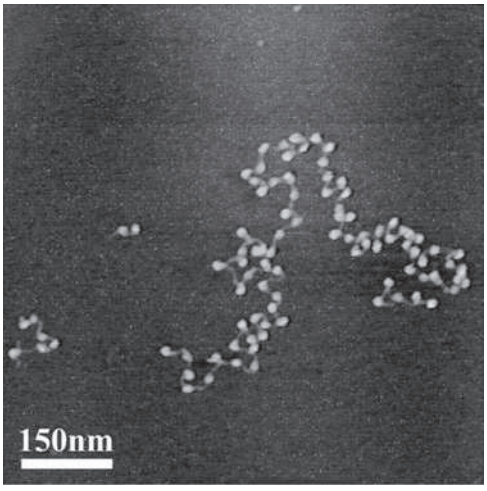


FIGURA 35-1 Eletromicrografia de nucleossomos (brancos, esféricos) presos a fitas de DNA (finos, linha cinza); ver também a Figura 35-2. (Reproduzida com a permissão de Shao Z: Probing nanometer structures with atomic force microscopy. News Physiol Sci,1999;14:142–149. Cortesia do Professor Zhifeng Shao, University of Virginia).

sumoilação. Essas modificações na histona desempenham um importante papel na estrutura da cromatina, como ilustrado na **Tabela 35-1**. As histonas interagem umas com as outras de maneiras muito específicas: **H3 e H4 formam um tetrâmero**, contendo duas moléculas de cada $(H3\text{-}H4)_2$, enquanto **H2A e H2B formam dímeros** (H2A-H2B). Sob condições fisiológicas, esses oligômeros de histona se associam para formar o **octâmero de histona** de composição $(H3–H4)_2–(H2A–H2B)_2$.

O nucleossomo contém histona e DNA

Quando o octâmero de histona é misturado com dsDNA purificados sob condições iônicas adequadas, o padrão de difração for-

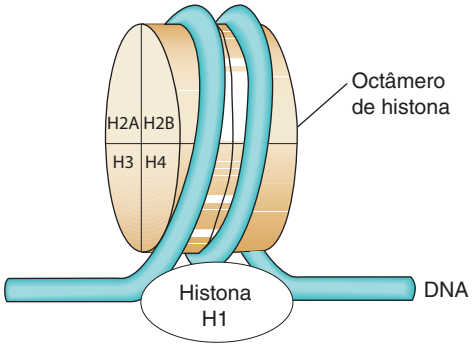


FIGURA 35-2 Modelo para a estrutura do nucleossomo no qual o DNA está embrulhado em volta da superfície de um cilindro de proteína achatada consistindo em duas de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4 que formam o octâmero de histona. Os cerca de 145 pb de DNA, consistindo em 1,75 voltas super-helicoidais, estão em contato com o octâmero de histonas. A posição da histona H1, quando ela está presente, é indicada pelo contorno tracejado na parte de baixo da figura. A histona H1 interage com o DNA à medida que ela entra e sai do nucleossomo.

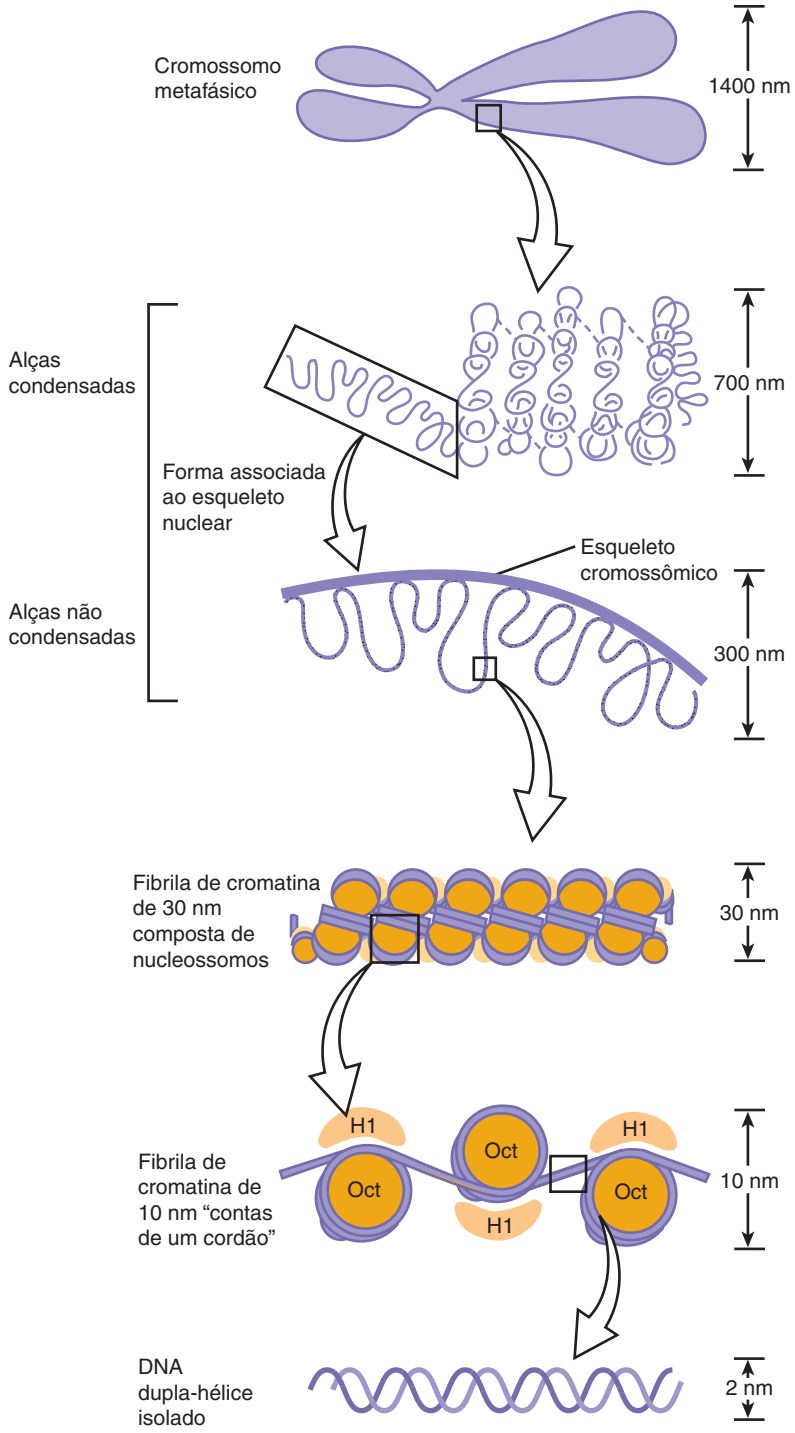


FIGURA 35-3 Apresentação do grau de compactação do DNA nos cromossomos metafásicos (topo) a partir da fita dupla de DNA observada (embaixo). O DNA cromossômico é compactado e organizado em vários níveis como mostrado (ver Tabela 35-2). Cada fase de condensação ou compactação e organização (de baixo para cima) diminui a acessibilidade geral do DNA a tal ponto das sequências de DNA nos cromossomos metafásicos serem quase que totalmente inertes em termos transcricionais. Ao todo, esses cinco níveis de compactação resultam em uma diminuição do comprimento linear de aproximadamente 10^4 vezes de ponta a ponta. A condensação completa e a descompactação do DNA linear nos cromossomos ocorrem em um espaço de horas durante o ciclo celular replicativo normal (ver Figura 35-20).

mado no raio X é o mesmo observado em cromatinas recém-isoladas. Estudos de microscopia eletrônica confirmam a existência de nucleossomos reconstituídos. Além disso, a reconstituição de nucleossomos a partir do DNA e das histonas H2A, H2B, H3 e H4 é independente da origem celular ou do organismo de seus vários componentes. Nem a histona H1 nem as proteínas não histonas são necessárias para a reconstituição do núcleo do nucleossomo.

No nucleossomo, o DNA é super-helicoidal, com uma hélice enrolada para a esquerda sobre a superfície de um octâmero de histona em forma de disco (Figura 35-2). A maioria das proteínas do núcleo da histona interage com o DNA no interior da super-hélice, sem se projetar, embora se acredite que as caudas aminoterminais de todas as histonas se estendam para fora dessa estrutura e estejam disponíveis para as PTMs reguladoras (ver Tabela 35-1).

O tetrâmero $(H3–H4)_2$ pode, por si só, conferir propriedades semelhantes às do nucleossomo ao DNA e, portanto, desempenhar um papel central na formação do nucleossomo. A adição de dois dímeros H2A-H2B estabiliza a partícula primária e liga

TABELA 35-1 Possíveis papéis das histonas modificadas

1. A acetilação das histonas H3 e H4 é associada à ativação ou à inativação da transcrição gênica.
2. A acetilação das histonas nucleares é associada à formação de cromossomos durante a replicação de DNA.
3. A fosforilação da histona H1 é associada à condensação dos cromossomos durante o ciclo de replicação.
4. A ADP-ribolização das histonas é associada ao reparo do DNA.
5. A metilação das histonas é correlacionada à ativação e à repressão da transcrição gênica.
6. A monoubiquitilação é associada à ativação gênica, repressão e silenciamento dos genes heterocromáticos.
7. A sumoilação das histonas (SUMO; modificador pequeno relacionado à ubiquitina) é associada à repressão da transcrição.

firmemente duas meias-voltas adicionais de DNA, previamente ligadas apenas frouxamente a $(H3\text{-}H4)_2$. Assim, as 1,75 voltas de DNA super-helicoidal são enroladas em torno da superfície do octâmero de histona, protegendo os 145 a 150 pb de DNA e formando a partícula do núcleo do nucleossomo (Figura 35-2). Na cromatina, as partículas nucleares são separadas por uma região de cerca de 30 pb de DNA, denominada de "**ligadora**". A maior parte do DNA está em uma série de repetições dessas estruturas, conferindo a aparência de contas de um cordão, quando observadas por microscopia eletrônica (ver Figura 35-1).

A montagem dos nucleossomos é mediada por um dentre diversos fatores de montagem da cromatina nuclear, facilitados pelas chaperonas de histonas, um grupo de proteínas que exibe alta afinidade de ligação às histonas. À medida que o nucleossomo é montado, as histonas são liberadas das chaperonas. Os nucleossomos parecem ter preferência por certas regiões específicas das moléculas de DNA, mas a base dessa distribuição não aleatória, chamada de **faseamento**, ainda não foi completamente compreendida. O faseamento está provavelmente relacionado tanto à relativa flexibilidade física de sequências nucleotídicas específicas, para acomodar as regiões de torção no interior da super-hélice, bem como à presença de outros fatores ligados ao DNA, que limitam os locais de deposição de nucleossomos.

ESTRUTURAS DE ORDEM SUPERIOR PROPORCIONAM A COMPACTAÇÃO DA CROMATINA

A microscopia eletrônica da cromatina revela duas ordens de estrutura superior – a fibrila de 10 nm e a fibra de cromatina de 30 nm – além daquela do próprio nucleossomo. A estrutura do nucleossomo é semelhante à de um disco, possuindo 10 nm de diâmetro e 5 nm de altura. A **fibrila de 10 nm** consiste em nucleossomos dispostos com suas bordas separadas por uma pequena distância (30 pb de DNA) com suas faces planas paralelas ao eixo da fibrila (Figura 35-3). A fibrila de 10 nm é provavelmente supertorcida adicionalmente com seis ou sete nucleossomos por volta da super-hélice para formar a **fibra de cromatina de 30 nm** (Figura 35-3). Cada volta da super-hélice é relativamente plana, e as faces dos nucleossomos de voltas sucessivas seriam aproximadamente paralelas umas às outras. As histonas H1 parecem estabilizar a fibra de 30 nm, mas suas posições e aquela do espaçador de DNA de comprimento variável não são claras. É provável que os nucleossomos possam formar diversas estruturas compactadas. Para formar um cromossomo mitótico, a fibra de 30 nm deve ser compactada em comprimento outras 100 vezes (ver adiante).

Nos **cromossomos da interfase**, as fibras de cromatina parecem estar organizadas em **alças ou domínios** de 30.000 a 100.000 pb ancorados em um esqueleto (ou matriz de suporte) no interior do núcleo, a chamada **matriz nuclear**. No interior desses domínios, algumas sequências de DNA podem estar localizadas de modo não aleatório. Foi sugerido que cada volta ou domínio de cromatina corresponde a uma ou mais funções genéticas separadas, contendo tanto regiões codificadoras quanto não codificadoras do gene ou genes cognatos. Essa arquitetura nuclear é provavelmente dinâmica, tendo importantes efeitos reguladores sobre a regulação do gene. Dados recentes sugerem que certos genes ou regiões de genes são móveis no interior do núcleo, movendo-se obrigatoriamente para *loci* discretos no interior do núcleo a partir de ativação. Trabalhos adicionais poderão determinar se esse fenômeno é geral e quais são os mecanismos moleculares envolvidos.

ALGUMAS REGIÕES DA CROMATINA SÃO "ATIVAS" E OUTRAS SÃO "INATIVAS"

Geralmente, cada célula de um organismo metazoário individual contém a mesma informação genética. Assim, as diferenças entre os tipos de células no interior de um organismo podem ser explicadas pela expressão diferencial da informação genética comum. A cromatina que contém genes ativos (i.e., a cromatina ativa transcricionalmente ou potencialmente transcricional) mostrou-se diferente, de várias maneiras, daquelas de regiões inativas. A estrutura do nucleossomo de cromatina ativa parece estar alterada, algumas vezes de modo muito extenso, em regiões altamente ativas. O DNA na cromatina ativa contém grandes regiões (em torno de 100 mil bases de extensão) relativamente mais **sensíveis à digestão por uma nuclease**, tais como a DNase I. A DNase I faz cortes na fita simples em quase todo segmento de DNA (isto é, baixa especificidade de sequência). Ela irá digerir o DNA que não estiver protegido ou ligado por uma proteína aos desoxinucleotídeos que o compõem. A sensibilidade à DNase I das regiões de cromatina ativa reflete apenas um potencial para a transcrição, em vez da transcrição em si, e em vários sistemas pode estar correlacionada a uma relativa perda de 5-metildesoxicitidina (meC) no DNA e em variantes de histonas particulares e/ou nos PTMs (fosforilação, acetilação, etc; ver Tabela 35-1).

No interior de grandes regiões de cromatina ativa existem segmentos mais curtos de 100 a 300 nucleotídeos, que exibem uma sensibilidade ainda maior (outras 10 vezes) à DNase I. Esses **locais de hipersensibilidade** provavelmente resultam de uma conformação estrutural que favorece o acesso da nuclease ao DNA. Essas regiões estão frequentemente localizadas imediatamente acima do

gene ativo e são o local de interrupção da estrutura do nucleossomo, provocada pela ligação a proteínas não histonas que são fatores reguladores da transcrição (ver Capítulos 36 e 38). Em muitos casos, parece que, se um gene é capaz de ser transcrito, ele muito frequentemente apresenta um local ou locais de hipersensibilidade à DNase I na cromatina do trecho imediatamente acima. Como observado anteriormente, as proteínas não histonas reguladoras envolvidas no controle da transcrição, e aquelas envolvidas na manutenção do acesso à fita-molde, levam à formação de locais de hipersensibilidade. Tais locais muitas vezes fornecem a primeira pista sobre a presença e localização de um elemento de controle da transcrição.

Em contrapartida, a cromatina inativa transcricionalmente é densamente compactada durante a interfase, como observado por estudos de microscopia eletrônica, e é chamada de **heterocromatina**; a cromatina ativa transcricionalmente cora menos densamente e é chamada de **eucromatina**. Geralmente, a eucromatina é replicada mais cedo que a heterocromatina nos ciclos celulares dos mamíferos (ver a seguir). A cromatina nessas regiões de inatividade é frequentemente alta em conteúdo de meC, e suas histonas contêm níveis relativamente menores de modificações covalentes.

Há dois tipos de heterocromatina: constitutiva e facultativa. A **heterocromatina constitutiva** está sempre condensada e, portanto, é essencialmente nativa. Ela é encontrada em regiões próximas ao centrômero cromossomal e nas extremidades cromossomais (telômeros). A **heterocromatina facultativa** está, algumas vezes, condensada, mas outras vezes é transcrita ativamente e, portanto, não é condensada, sendo semelhante à eucromatina. Dos dois membros do par de cromossomos X de fêmeas de mamíferos, um cromossomo X é quase completamente inativo transcricionalmente e é heterocromático. Entretanto, o cromossomo X heterocromático descondensa durante a gametogênese e se torna transcricionalmente ativo no início da embriogênese – assim, ele é uma heterocromatina facultativa.

Certas células de insetos, por exemplo, de *Chironomus* e *Drosophila*, contêm cromossomos gigantes que foram replicados por ciclos múltiplos sem separação das cromátides-filhas. Essas cópias de DNA se alinham lado a lado em um registro preciso e produzem um cromossomo com bandas que contêm regiões de cromatina condensada e bandas mais claras de cromatina mais solta. Regiões transcricionalmente ativas desses **cromossomos politênicos** são especialmente descondensadas em ***puffs***, que podem conter as enzimas responsáveis pela transcrição e serem locais de síntese de RNA (**Figura 35-4**). Utilizando-se sondas de hibridização altamente sensíveis marcadas fluorescentemente, sequências de genes específicas podem ser mapeadas, ou "pintadas", no interior de núcleos de células humanas, mesmo sem a formação de cromossomos politênicos, utilizando técnicas de FISH (hibridização *in situ* por fluorescência; Capítulo 39).

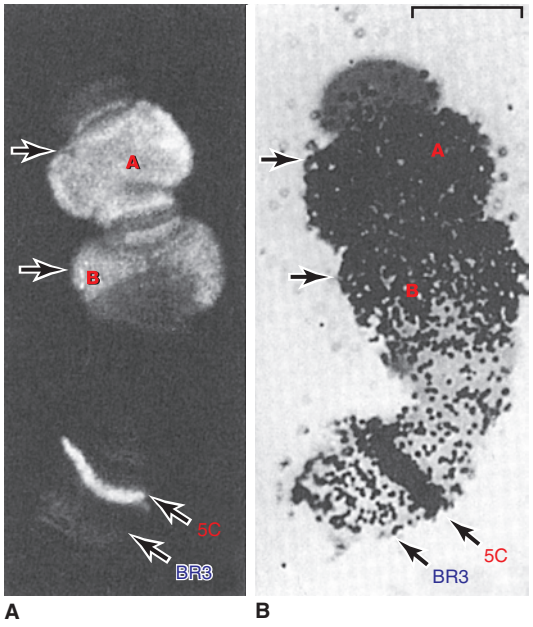


FIGURA 35-4 Ilustração da correlação estreita entre a presença da RNA-polimerase II (Tabela 36-2) e a síntese do RNA mensageiro. Vários genes, marcados como A, B (em cima) e 5C, mas não os genes no *locus* (banda) BR3 (5C, BR3, embaixo) são ativados quando as larvas de *Chironomus tentans* são submetidas a choque térmico (39º C por 30 min). (**A**) Distribuição da RNA-polimerase II no cromossomo IV isolado de glândula salivar (**nas setas**). A enzima foi detectada por imonofluorescência usando um anticorpo direcionado contra a polimerase. As áreas 5C e BR3 são bandas específicas do cromossomo IV, e as setas indicam *puffs*. (**B**) Autorradiograma de um cromossomo IV que foi incubado em 3H-uridina para marcar o RNA. Observe a correspondência entre a imunofluorescência e a presença de RNA radiativo (pontos pretos). Bar = 7μm. (Reproduzida com a permissão de Sass H: RNA polymerase B in polytene chromosomes. Cell 1982;28:274. Copyright c 1982. Reproduzido com a permissão de Elsevier).

O DNA É ORGANIZADO EM CROMOSSOMOS

Na metáfase, os **cromossomos** de mamíferos têm simetria dupla, com cromátides-irmãs idênticas duplicadas, conectadas no **centrômero**, cuja posição relativa é característica de um determinado cromossomo (**Figura 35-5**). O centrômero é uma região rica em adenina-timina (A-T) contendo sequências de DNA repetidas, que variam em tamanho de 10^2 (levedura de cerveja) a 10^6 (mamíferos) pares de bases (pb). Os centrômeros dos metazoários estão presos por nucleossomos contendo a proteína variante de histona H3 CENP-A e outras proteínas específicas ligadoras de centrômero. Esse complexo, chamado de **cinetócoro**, fornece a âncora para o fuso mitótico. Ele, assim, é uma estrutura essencial para a segregação cromossomal durante a mitose.

As extremidades de cada cromossomo contêm estruturas chamadas de **telômeros**, que consistem em repetições curtas ricas em T-G. Os telômeros humanos possuem um número variável de repetições da sequência 5′-TTAGGG-3′, que pode se estender por várias quilobases. A **telomerase**, subunidade múltipla contendo moldes de RNA, relacionada de maneira complexa a RNAs virais dependentes de DNA-polimerases (transcriptases reversas), é a enzima responsável pela síntese telomérica e, portanto, por manter o comprimento do telômero. Uma vez que o encurtamento do telômero tem sido associado tanto à malignidade quanto ao envelhecimento, essa enzima se tornou um alvo atrativo para a quimioterapia do câncer e para o desenvolvimento de medicamentos. Cada cromátide-irmã contém uma molécula de dsDNA. Durante a interfase,

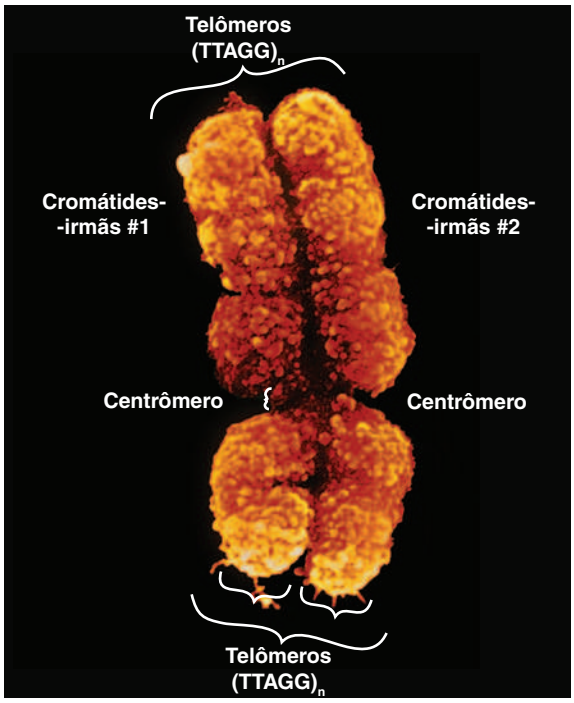


FIGURA 35-5 As duas cromátides-irmãs do cromossomo humano 12 em mitose. A localização da região centromérica rica em A-T conectando as duas cromátides-irmãs é indicada, bem como dois dos quatro telômeros, encontrados nas extremidades das cromátides que se prendem uma à outra no centrômero (Cortesia de Biophoto Associates/Photo Researchers, Inc).

a condensação da molécula de DNA é menor do que a condensação do cromossomo durante a metáfase. Os cromossomos metafásicos são quase que completamente inativos transcricionalmente.

TABELA 35-2 Proporções de empacotamento ou compactação de cada uma das ordens da estrutura de DNA

Forma da cromatina	Taxa de compactação
Dupla-hélice de DNA isolada ~ 1,0	~1.0
Fibrilas de nucleossomos de 10nm 7-10	7–10
Fibra de cromatina de 30 nm de nucleossomos super-helicoidais 40-60	40–60
Cromossomo metafásico condensado com domínios em alça	8.000

O genoma haploide humano consiste em cerca de 3×10^9 pb e cerca de $1{,}7 \times 10^7$ nucleossomos. Assim, cada uma das 23 cromátides no genoma haploide humano conteria, em média, $1{,}3 \times 10^8$ nucleotídeos em uma molécula de dsDNA. Portanto, o comprimento de cada molécula de DNA deve ser comprimido cerca de 8.000 vezes para gerar a estrutura de um cromossomo metafásico condensado. Em cromossomos metafásicos, as fibras de cromatina de 30 nm também são dobradas em uma série de **domínios em alça**, cujas porções proximais estão ancoradas a um esqueleto de matriz nuclear proteinácea, não baseada em histona, no interior do núcleo (Figura 35-3). As proporções de compactação de cada uma das ordens da estrutura do DNA estão resumidas na **Tabela 35-2**. A compactação das nucleoproteínas no interior da cromátide não é aleatória, como evidenciado por padrões característicos observados quando os cromossomos são corados com corantes específicos tais como a quinacrina ou a coloração de Giemsa (**Figura 35-6**).

De indivíduo para indivíduo em uma mesma espécie, o padrão de coloração (bandeamento) do complemento do cromossomo inteiro é altamente reproduzível; entretanto, ele difere significativamente entre espécies, mesmo entre as proximamente relacionadas.

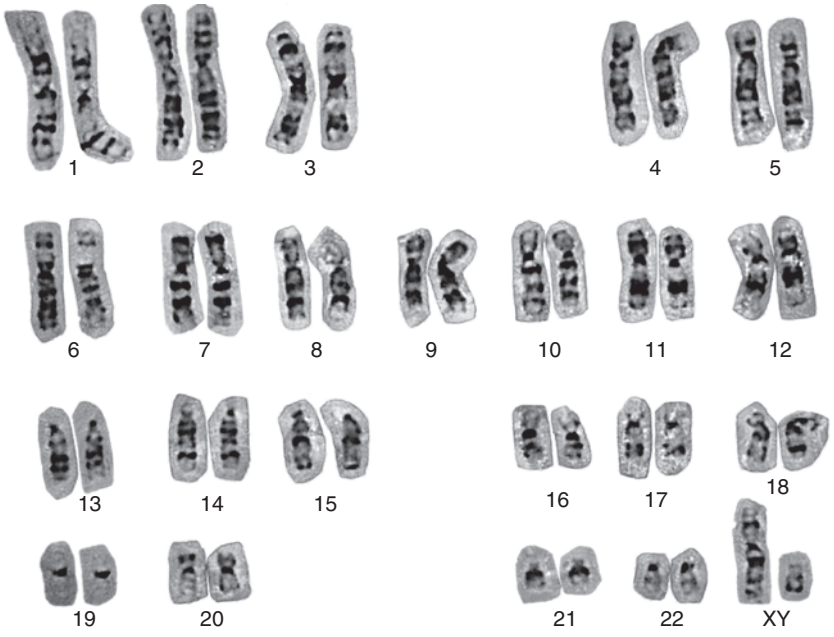


FIGURA 35-6 Cariótipo humano (de homem com constituição normal, 46, XY) no qual os cromossomos metafásicos foram corados pelo método de Giemsa e dispostos de acordo com a Convenção de Paris. (Cortesia de H. Lawce e F. Conte).

Assim, a compactação das nucleoproteínas nos cromossomos de eucariotos superiores deve ser, de algum modo, dependente de características específicas das moléculas de DNA de cada espécie.

Uma combinação de técnicas de coloração especializadas e de microscopia de alta resolução tem permitido aos citogeneticistas mapear com muita precisão vários genes para regiões específicas de cromossomos de ratos e de humanos. Com a elucidação recente das sequências dos genomas de ratos e de humanos (entre outros), ficou claro que muitos desses métodos de mapeamento visual eram notavelmente precisos.

Regiões de codificação são frequentemente interrompidas por sequências intervenientes

As **regiões codificadoras de proteínas no DNA**, cujas transcrições, em última análise, aparecem no citoplasma como moléculas únicas de mRNA, são geralmente **interrompidas no genoma eucariótico por grandes sequências intervenientes de DNA não codificador de proteína**. Consequentemente, os **transcritos primários do DNA**, os **precursores de mRNA** (originalmente denominado de **hnRNA,** porque esse tipo de RNA era bastante heterogêneo em tamanho [comprimento] e praticamente restrito ao núcleo), contêm sequências intervenientes não codificadoras de RNA que devem ser removidas em um processo que também une os segmentos de codificação adequados para formar um mRNA maduro. A maior parte das sequências codificadoras para um único mRNA é interrompida no genoma (e, portanto, no transcrito primário) por pelo menos uma – e, em alguns casos, por até 50 – sequências intervenientes não codificadoras (**íntrons**). Na maioria dos casos, os íntrons são muito maiores que as regiões codificadoras (**éxons**). O processamento do transcrito primário, que envolve a remoção precisa de íntrons e o *splicing* de éxons adjacentes, é descrito no Capítulo 36.

A função das sequências intervenientes, ou íntrons, não está totalmente esclarecida. Os íntrons podem servir para separar domínios funcionais (éxons) de informação codificadora de modo a permitir a ocorrência mais rápida do rearranjo genético por recombinação do que se todas as regiões codificadoras para uma determinada função genética fossem contíguas. Tal proporção melhorada de rearranjo genético de domínios funcionais poderia permitir uma evolução mais rápida das funções biológicas. Em alguns casos, outras proteínas ou RNA não codificadores estão localizados no interior do DNA intrônico de certos genes (Capítulo 34). As relações entre o DNA cromossomal, os agrupamentos de genes no cromossomo, a estrutura éxon-íntron dos genes e o produto final do mRNA estão ilustradas na **Figura 35-7**.

GRANDE PARTE DO GENOMA DE MAMÍFEROS PARECE REDUNDANTE E GRANDE PARTE NÃO É ALTAMENTE TRANSCRITA

O genoma haploide de cada célula humana consiste em 3×10^9 pb de DNA subdividido em 23 cromossomos. O genoma haploide completo contém DNA suficiente para codificar aproximadamente 1,5 milhão de genes de tamanho médio. Entretanto, estudos sobre as taxas de mutação e sobre a complexidade dos genomas dos organismos superiores sugerem fortemente que os humanos possuem significativamente menos de 100 mil proteínas codificadas por aproximadamente 1% do genoma humano, o qual é composto por DNA exônico. De fato, as estimativas atuais sugerem que existam 25.000 ou menos genes codificadores de proteínas em humanos. Isso implica que a maior parte do DNA é não codificador de proteína – isto é, sua informação nunca é traduzida em uma sequência de aminoácidos de uma molécula de proteína. Certamente, uma parte das sequências de DNA em excesso serve para regular a expressão de genes durante o desenvolvimento, a diferenciação, e a adaptação ao ambiente, tanto servindo como sítios de ligação para proteínas reguladoras quanto codificando RNA reguladores (i.e., miRNA e ncRNA). Alguns excessos claramente constituem as sequências intervenientes ou íntrons (24% do total do genoma humano) que separam as regiões codificadoras dos genes. Outra porção de excesso parece ser composta por muitas famílias de sequências repetidas para as quais funções claras ainda não foram definidas, embo-

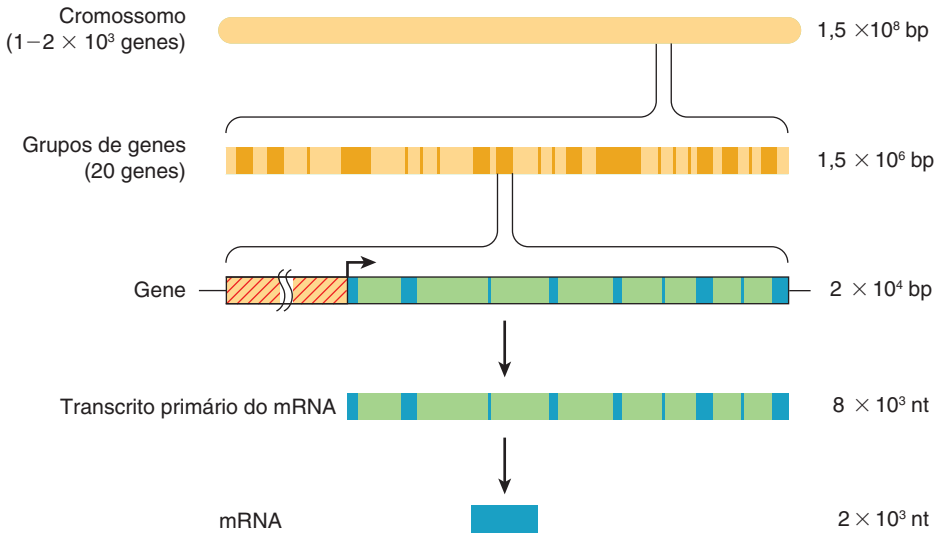


FIGURA 35-7 A relação entre o DNA cromossomal e o mRNA. O complemento do DNA haploide humano de 3×10^9 pb é distribuído por 23 cromossomos. Os genes estão frequentemente reunidos em grupos nesses cromossomos. Um gene médio tem 2×10^4 pb de comprimento, incluindo a região reguladora (área sombreada de vermelho), a qual é, em geral, localizada na terminação 5′ do gene. A região reguladora é apresentada aqui como adjacente ao local de início da transcrição (seta). A maioria dos genes de eucariotos tem éxons e íntrons alternados. Neste exemplo, há nove éxons (áreas coloridas de azul) e oito íntrons (áreas coloridas de verde). Os íntrons são removidos do transcrito primário pelas reações de processamento e os éxons são unidos em sequência para formar o mRNA maduro (nt, nucleotídeos).

ra alguns RNAs pequenos transcritos a partir dessas repetições possam modular a transcrição, tanto diretamente pela interação com a maquinaria de transcrição quanto indiretamente afetando a atividade do molde de cromatina. Um resumo das características principais do genoma humano é apresentado no Capítulo 39. Curiosamente, o Projeto de Consórcio ENCODE (Capítulo 39) mostrou que para o 1% do genoma estudado, a maior parte da sequência genômica era, na verdade, transcrita em uma taxa reduzida. Pesquisas adicionais irão elucidar o(s) papel(éis) desempenhado(s) por tais transcritos.

O DNA em um genoma eucariótico pode ser dividido em diferentes "classes de sequências". Elas são sequências únicas de DNA, ou sequências de DNA repetitivo e de DNA não repetitivo. No genoma haploide, a sequência única de DNA geralmente inclui os genes de cópia única que codificam proteínas. O DNA repetitivo no genoma haploide inclui sequências que variam em número de cópias de 2 até 10^7 por célula.

Mais da metade do DNA em organismos eucarióticos está em sequências únicas ou não repetitivas

Essa estimativa (e a distribuição do DNA de sequência repetitiva) baseia-se em uma variedade de técnicas de hibridização de DNA-RNA e, mais recentemente, no sequenciamento direto do DNA. Técnicas semelhantes são utilizadas para estimar o número de genes ativos em uma população de DNA de sequência única. Na levedura de cerveja (*Saccharomyces cerevisiae*, um eucarioto inferior), cerca de dois terços dos 6.200 genes são expressos, mas apenas cerca de um quinto são necessários para a viabilidade em condições de crescimento em laboratório. Nos tecidos típicos de eucariotos superiores (p. ex., rins e fígado de mamíferos) de 10.000 a 15.000 genes são ativamente expressos. É claro que diferentes combinações de genes são expressas em cada tecido, e como isto é realizado constitui uma das principais questões não respondidas em biologia.

No DNA humano, pelo menos 30% do genoma consistem em sequências repetitivas

O DNA de sequência repetitiva pode ser amplamente classificado como moderadamente repetitivo ou altamente repetitivo. As sequências altamente repetitivas consistem em 5 a 500 pares de bases de comprimento repetido várias vezes em sequência. Estas sequências estão geralmente agrupadas nos centrômeros e telômeros do cromossomo e algumas estão presentes em cerca de 1 a 10 milhões de cópias por genoma haploide. A maioria dessas sequências é transcricionalmente inativa, e algumas desempenham função estrutural no cromossomo (Figura 35-5; ver Capítulo 39).

As sequências moderadamente repetitivas, que são definidas como estando presentes em um número de menos de 10^6 cópias por genoma haploide, não estão agrupadas, mas são intercaladas com sequências únicas. Em muitos casos, essas repetições longas intercaladas são transcritas pela RNA-polimerase II e contêm coberturas indistinguíveis daquelas do mRNA.

Dependendo do seu comprimento, as sequências moderadamente repetitivas são classificadas em **sequências repetitivas intercaladas longas** (**LINEs**) ou **sequências repetitivas intercaladas curtas** (**SINEs**). Ambos os tipos parecem ser **retroposons**; isto é, elas surgiram a partir do movimento de um local para o outro (**transposição**) por meio de um intermediário de RNA, pela ação da transcriptase reversa que transcreve um molde de RNA em DNA. Os genomas de mamíferos contêm de 20.000 a 50.000 cópias de LINEs de 6 a 7 kpb. Eles representam famílias de elementos repetitivos específicos de cada espécie. Os SINEs são mais curtos (70 a 300 pb), e podem existir mais de 100 mil cópias por genoma. Dos SINEs no genoma humano, uma família, a **família Alu**, está presente em cerca de 500 mil cópias por genoma haploide e representa cerca de 10% do genoma humano. Os membros da família humana Alu e seus análogos estreitamente relacionados em outros animais são transcritos como componentes integrais de precursores de mRNA ou como moléculas de RNA discretas, incluindo os bem estudados RNA 4,5S e RNA 7S. Os membros dessa família particular são altamente conservados dentro de uma mesma espécie bem como entre espécies de mamíferos. Os componentes das repetições intercaladas curtas, incluindo os membros da família Alu, podem ser elementos móveis, capazes de saltar para dentro e para fora de vários sítios no interior do genoma (ver a seguir). Esses eventos de transposição podem ter resultados desastrosos como exemplificado pela inserção de sequências Alu em um gene que, quando sofre uma mutação, provoca a neurofibromatose. Além disso, os RNA SINE Alu B1 e B2 parecem regular a produção de mRNA e os níveis de transcrição e *splicing* de mRNA.

Sequências de repetição microssatélites

Uma categoria de sequências repetitivas existe tanto dispersa quanto agrupada em conjuntos de sequências. As sequências consistem em 2 a 6 pb repetidas até 50 vezes. Essas **sequências microssatélites** são encontradas mais comumente como repetições de dinucleotídeos de AC em uma fita e TG na fita oposta, mas várias outras formas podem ocorrer, incluindo CG, AT e CA. As sequências repetitivas AC ocorrem em 50.000 a 100.000 locais no genoma. Em qualquer *locus*, o número dessas repetições pode variar nos dois cromossomos, e assim fornecer heterozigosidade no número de cópias de um número particular de microssatélites em um indivíduo. Este é um traço hereditário, e devido ao seu número e à facilidade de detectá-las utilizando a **reação em cadeia da polimerase** (**PCR**) (Capítulo 39), tais repetições são úteis na construção de mapas de ligação genética. A maior parte dos genes está associada a um ou mais marcadores microssatélites, assim, tanto a posição relativa dos genes nos cromossomos pode ser avaliada quanto pode a associação entre um gene e uma doença. Utilizando PCR, um grande número de membros de uma família pode ser rapidamente rastreado para um determinado **polimorfismo de microssatélite**. A associação de um polimorfismo específico com um gene em membros de uma família afetada – e a ausência de tal associação em membros não afetados – pode ser a primeira pista sobre a base genética de uma doença.

Sequências de trinucleotídeos que aumentam em número (instabilidade de microssatélite) podem provocar doenças. A sequência repetitiva instável $p(CGG)_n$ está associada à síndrome do X frágil. Outras repetições de trinucleotídeos que sofrem mutação dinâmica (geralmente um aumento) estão associadas à coreia de Huntington (CAG), à distrofia miotônica (CTG), à atrofia muscular espinobulbar (CAG) e à doença de Kennedy (CAG).

A MITOCÔNDRIA CONTÉM 1% DO DNA CELULAR

A maioria dos polipeptídeos na mitocôndria (cerca de 54 de 67) é codificada por genes nucleares, enquanto o restante é codificado por genes encontrados no DNA mitocondrial (mtDNA). A mitocôndria humana contém de 2 a 10 cópias de uma molécula circular pequena de dsDNA, constituindo aproximadamente 1% do DNA celular total. Esse mtDNA codifica RNA ribossomais e transportadores específicos das mitocôndrias e também codifica 13 proteínas que desempenham papéis essenciais na cadeia respiratória (Capítulo 13). O mapa estrutural linearizado dos genes mitocondriais humanos é mostrado na **Figura 35-8**. Algumas das características do mtDNA são mostradas na **Tabela 35-3**.

Uma característica importante do mtDNA humano é que – como todas as mitocôndrias são fornecidas pelo óvulo durante a formação do zigoto – ele é transmitido por herança materna não mendeliana. Assim, em doenças que resultam de mutações no mtDNA, uma mãe afetada poderia, teoricamente, transmitir a doença para todas as suas crianças, mas apenas suas filhas poderiam transmitir o traço. Entretanto, em alguns casos, deleções no mtDNA ocorrem durante a oogênese e, portanto, não são herdadas da mãe. Várias doenças já se mostraram serem o resultado de mutações no mtDNA. Elas incluem uma variedade de miopatias, doenças neurológicas e alguns casos de diabetes melito.

TABELA 35-3 Principais características do DNA mitocondrial humano

• É circular, de fita dupla e é composto por cadeias ou fitas pesadas (H) e leves (L).
• Contém 16.569 pb
• Codifica 13 subunidades de proteínas da cadeia respiratória (de um total de 67) Sete subunidades da NADH desidrogenase (complexo I) Citocromo *b* do complexo III Três subunidades da citocromo-oxidase (complexo IV) Duas subunidades da ATP-sintase
• Codifica RNA ribossomais mitocondriais grandes (16S) e pequenos (12S)
• Codifica 22 moléculas de tRNA mitocondriais
• O código genético difere ligeiramente do código padrão UGA (códon padrão de parada) é lido como Trp AGA e AGG (códons padrão para Arg) são lidos como códons de parada
• Contém muito poucas sequências não traduzidas
• Alta taxa de mutação (5 a 10 vezes maior do que aquela do DNA nuclear)
• Comparações das sequências de mtDNA fornecem evidência acerca das origens evolutivas de primatas e outras espécies.

Fonte: Adaptada de Harding AE: Neurological disease and mitochondrial genes. Trends Neurol Sci 1991;14:132. Copyright © 1991. Reimpresso com a permissão de Elsevier.

O MATERIAL GENÉTICO PODE SER ALTERADO E REARRANJADO

Uma alteração na sequência das bases de purina e pirimidina em um gene se deve a uma mudança – uma remoção ou uma inserção – em uma ou mais bases e pode resultar em um produto de gene alterado. Tal alteração no material genético leva a uma **mutação**, cujas consequências são discutidas em detalhe no Capítulo 37.

A recombinação cromossomal é um modo de rearranjar o material genético

A informação genética pode ser trocada entre cromossomos semelhantes ou homólogos. A troca, ou evento de **recombinação**, ocorre principalmente durante a meiose nas células de mamíferos e necessita do alinhamento de cromossomos homólogos metafásicos, o qual quase sempre ocorre com grande exatidão.

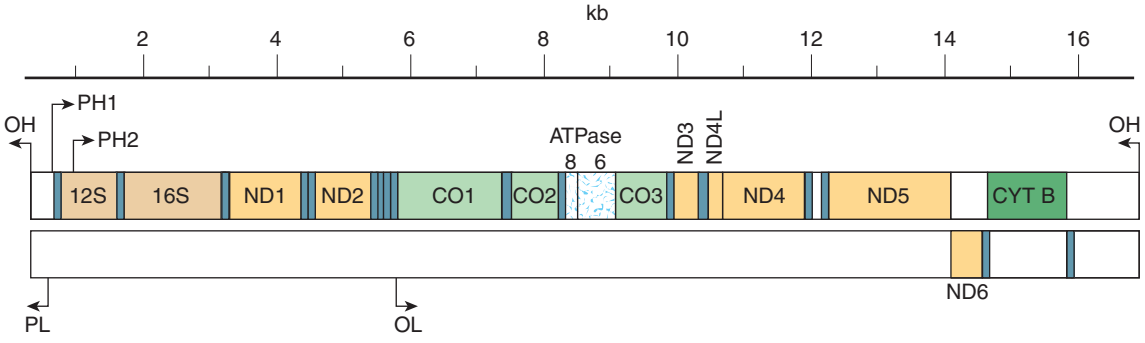


FIGURA 35-8 Mapas dos genes mitocondriais humanos. Os mapas representam as chamadas fitas pesadas (fita superior) e as fitas leves (mapa inferior) do DNA mitocondrial linearizado (mt), mostrando os genes para as subunidades da NADH-coenzima Q oxirredutase ND1 a ND6), citocromo *c* oxidase (CO1 a CO3), citocromo *b* (CYT B) e ATP-sintase (ATPase 8 e 6) e para os rRNA mitocondriais 12S e 16S. Os RNA transportadores são indicados pelas pequenas caixas azuis. As origens das replicações de fitas pesadas (OH) e fitas leves (OL) e os promotores para a iniciação da transcrição das fitas pesadas (PH1 e PH2) e fitas leves (PL) são indicados por setas. (Reproduzida com a permissão de Moraes CT et al: Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. N Engl J Med 1989;320:1293.Copyright c1989. Massachusetts Medical Society, EUA. Todos os direitos reservados).

Um processo de *crossing over* ocorre como mostrado na **Figura 35-9**. Isso geralmente resulta em uma troca igual e recíproca de informação genética entre cromossomos homólogos. Se os cromossomos homólogos possuem alelos diferentes dos mesmos genes, a troca pode produzir diferenças genéticas perceptíveis e hereditárias. Em casos raros em que o alinhamento de cromossomos homólogos não é exato, o *crossing over* ou o evento de recombinação pode resultar em uma troca de informação desigual. Um cromossomo pode receber menos material genético e, assim, uma deleção, enquanto o outro parceiro do par de cromossomos recebe mais material genético e, assim, uma inserção ou duplicação (Figura 35-9). *Crossing over* desigual ocorre em humanos, como evidenciado pela existência de hemoglobinas chamadas de **lepore** e **antilepore** (Figura 35-10). Quanto mais distantes se encontram duas sequências em um cromossomo individual, maior é a probabilidade de um evento de recombinação ou *crossing over*. Esta é a base dos métodos de mapeamento genético. Um ***crossing over* desigual** afeta conjuntos de sequências de DNAs repetidos quer eles estejam relacionados aos genes da globina, como na Figura 35-10, quer sejam DNA repetitivos mais abundantes. Um *crossing over* desigual por um deslizamento no emparelhamento pode resultar em expansão ou contração no número de cópias de uma família repetida e pode contribuir para a expansão e fixação de membros variantes em todo o conjunto repetido.

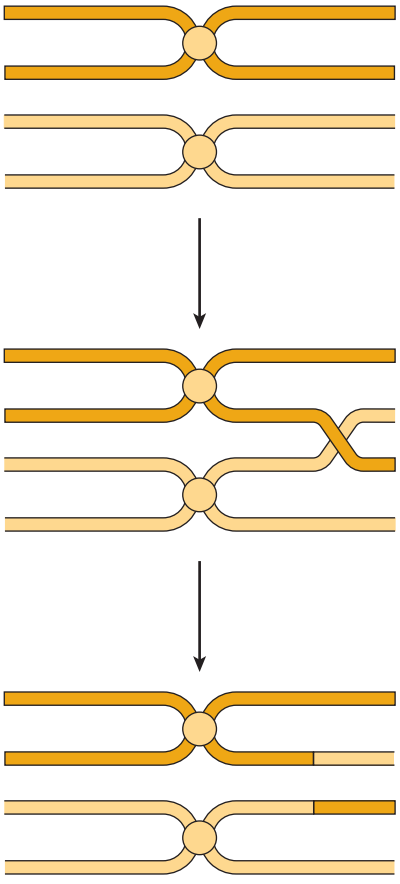


FIGURA 35-9 O processo de *crossing over* entre cromossomos homólogos metafásicos gerando cromossomos recombinantes. Ver também Figura 35-12.

A integração cromossomal ocorre em algumas viroses

Alguns vírus de bactérias (bacteriófagos) são capazes de se recombinar com o DNA de um hospedeiro bacteriano de tal modo que a informação genética do bacteriófago é incorporada de maneira linear à informação genética do hospedeiro. Esta integração, que é uma forma de recombinação, ocorre por um mecanismo ilustrado na **Figura 35-11**. O esqueleto do genoma circular do bacteriófago é quebrado, assim como a molécula de DNA do hospedeiro e as extremidades adequadas são religadas com a polaridade correta. O DNA do bacteriófago é, de um modo figurativo, esticado ("linearizado"), à medida que é integrado a uma molécula de DNA bacteriano, frequentemente também um círculo fechado. O local em que o genoma do bacteriófago irá se reintegrar ou recombinar com o genoma bacteriano é escolhido por um de dois mecanismos. Se o bacteriófago contém uma sequência de DNA **homóloga** a uma sequência na molécula de DNA do hospedeiro, então pode ocorrer um evento de recombinação análogo ao que acontece entre cromossomos homólogos. Entretanto, alguns bacteriófagos sintetizam proteínas que ligam sítios específicos dos cromossomos bacterianos a sítios **não homólogos** característicos da molécula de DNA do bacteriófago. A integração que ocorre nesse sítio é chamada de "**sítio-específica**".

Muitos vírus de animais, particularmente os vírus oncogênicos – tanto diretamente ou indiretamente, como no caso dos vírus de RNA como o HIV, que causa a Aids, em que seus transcritos de DNA gerados por ação de **DNA-polimerase dependente de RNA,** ou **transcriptase reversa** – podem ser integrados nos cromossomos das células de mamíferos. A integração do DNA de um vírus animal ao genoma animal geralmente não é "sítio-específica", porém apresenta preferências por locais.

A transposição pode produzir genes transformados

Em células eucarióticas, pequenos elementos de DNA que claramente não são vírus são capazes de autotransposição para dentro e para fora do genoma do hospedeiro de maneiras que afetam o funcionamento das sequências de DNA próximas. Esses elementos móveis, algumas vezes chamados de "**DNA saltador**", ou genes saltadores, podem carregar regiões adjacentes de DNA e, portanto, afetar profundamente a evolução. Como mencionado anteriormente, a família Alu de sequências moderadamente repetitivas de DNA apresenta características estruturais semelhantes aos terminais de retrovírus, o que explicaria a capacidade destes últimos de se moverem para dentro e para fora do genoma de mamíferos.

Evidências diretas para a transposição de outros elementos pequenos de DNA para o genoma humano foram fornecidas pela descoberta de "**genes transformados**" para moléculas de imunoglobulinas, moléculas de α-globinas e várias outras. Esses genes transformados consistem em sequências de DNA idênticas ou quase idênticas àquelas do RNA mensageiro para o produto adequado do gene. Isto é, a região de 5′ não traduzida, a região codificadora sem representação de íntrons e a cauda de 3′ poli(A), estão todas presentes contiguamente. Esse arranjo de sequência particular de DNA deve ter resultado de transcrição reversa de uma molécula de RNA mensageiro adequadamente

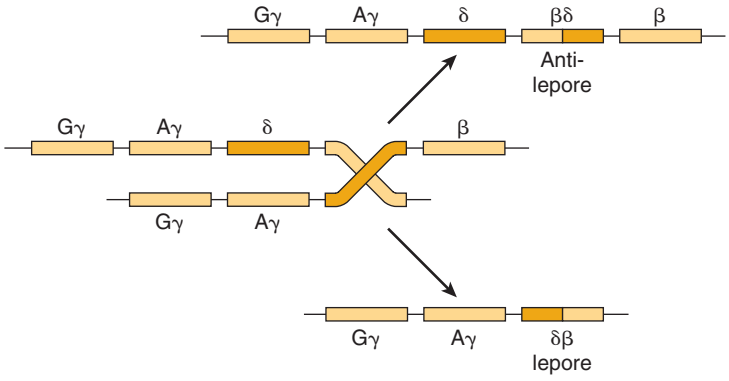


FIGURA 35-10 O processo de *crossing over* desigual na região do genoma de mamíferos que abriga os genes estruturais que codificam as hemoglobinas e a geração dos produtos recombinantes desiguais hemoglobina δ-β lepore e β-δ antilepore. Os exemplos fornecidos mostram as localizações das regiões de recombinação no interior das regiões codificadoras de aminoácidos dos genes indicados (i.e., genes das globinas β e δ). (Redesenhada e reproduzida com a permissão de Clegg JB, Weatherall DJ: β° Thalassemia: time for a reappraisal? Lancet 1974;2:133. Copyright c 1974. Reimpressa com a permissão de Elsevier).

transformada, da qual as regiões de íntrons foram removidas e a cauda poli(A) adicionada. O único mecanismo reconhecido que essa transcrição reversa poderia ter usado para se integrar ao genoma teria sido um evento de transposição. De fato, esses "genes transformados" apresentam repetições terminais curtas em cada extremidade, como o fazem as sequências transpostas conhecidas em organismos inferiores. Na ausência de suas transcrições e, assim, de seleção genética para a função, muitos dos genes transformados foram aleatoriamente alterados pela evolução, de modo que eles agora contêm códons sem sentido que impedem a sua capacidade de codificar uma proteína funcional intacta (ver Capítulo 37). Assim, eles são chamados de "**pseudogenes**".

A conversão gênica produz rearranjos

Além da recombinação e transposição desiguais, um terceiro mecanismo pode efetuar mudanças rápidas no material genético. Sequências semelhantes em cromossomos homólogos ou não homólogos podem, ocasionalmente, emparelhar e eliminar quaisquer sequências incompatíveis entre elas. Isso pode levar à fixação acidental de uma variante ou outra ao longo de uma família de sequências repetidas e, portanto, homogeneizar as sequências dos membros de famílias de DNAs repetitivos. Este último processo é chamado de **conversão do gene**.

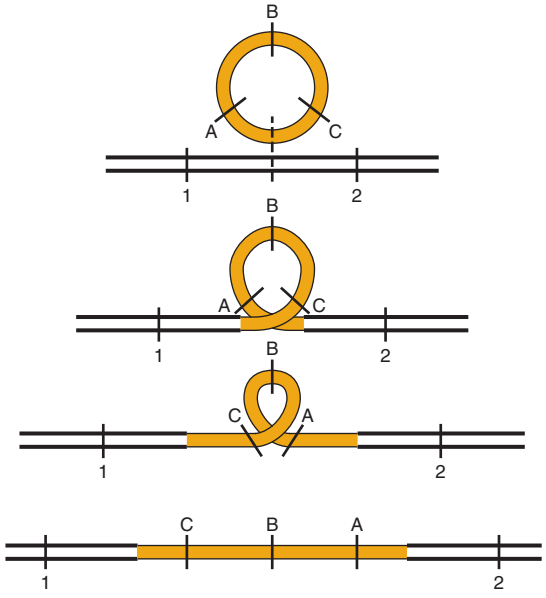


FIGURA 35-11 A integração de um genoma circular de um vírus (com genes A, B e C) na molécula de DNA de um hospedeiro (com genes 1 e 2) e a consequente ordenação dos genes.

Troca de cromátides-irmãs

Em organismos eucarióticos diploides como os humanos, após a passagem das células pela fase S, elas passam a ter um conteúdo tetraploide de DNA. Este se encontra na forma de cromátides-irmãs de pares de cromossomos (Figura 35-6). Cada uma dessas cromátides-irmãs contém informação genética idêntica, pois cada uma é produto da replicação semiconservativa da molécula parental original de DNA daquele cromossomo. O *crossing over* pode ocorrer entre essas cromátides-irmãs geneticamente idênticas. Naturalmente, essas **trocas de cromátides-irmãs** (**Figura 35-12**) não têm qualquer consequência genética desde que a troca resulte de um *crossing over* igual.

Rearranjo dos genes de imunoglobulinas

Em células de mamíferos, alguns interessantes rearranjos de genes ocorrem normalmente durante o desenvolvimento e a diferenciação. Por exemplo, em camundongos, os genes V_L e C_L para uma molécula única de imunoglobulina (ver Capítulo 38) estão amplamente separados na linhagem do DNA germinativo. No DNA de uma célula produtora de imunoglobulina diferenciada (plasma), os mesmos genes V_L e C_L foram deslocados fisicamente para ficarem mais próximos no genoma e na mesma unidade transcricional. Entretanto, ainda assim, esse rearranjo de DNA durante a diferenciação não torna os genes V_L e C_L contíguos no DNA. Em vez disso, o DNA contém uma sequência intercalada ou de interrupção de cerca de 1.200 pb na ou próxima da junção das regiões V e C. A sequência intercalada é transcrita em RNA com os genes V_L e C_L e a informação intercalada é removida do RNA durante o seu processamento nuclear (Capítulos 36 e 38).

A SÍNTESE E A REPLICAÇÃO DO DNA SÃO RIGIDAMENTE CONTROLADAS

A principal função da replicação do DNA é a de fornecer descendência proveniente da informação genética dos pais. Assim,

FIGURA 35-12 Trocas de cromátides-irmãs entre os cromossomos humanos. As trocas são detectáveis pela coloração de Giemsa dos cromossomos de células replicadas por dois ciclos na presença de bromodesoxiuridina. As setas indicam algumas regiões de troca (Cortesia de S Wolff e J Bodycote).

a replicação do DNA deve ser completa e realizada de modo a manter a estabilidade genética no interior do organismo e das espécies. O processo de replicação do DNA é complexo e envolve muitas funções celulares e vários procedimentos de verificação para garantir a fidelidade na replicação. Cerca de 30 proteínas estão envolvidas na replicação do cromossomo da *Escherichia coli*, e esse processo é mais complexo em organismos eucarióticos. As primeiras observações enzimológicas sobre a replicação do DNA foram feitas por Arthur Kornberg, quem descreveu em *E. coli* a presença de uma enzima atualmente chamada de DNA-polimerase I. Essa enzima possui múltiplas atividades catalíticas, uma estrutura complexa e uma necessidade dos quatro desoxirribonucleosídeos trifosfato de adenina, guanina, citosina e timina. A reação de polimerização catalisada pela DNA-polimerase I de *E. coli* serviu como um protótipo para todas as DNA-polimerases tanto de procariotos quanto de eucariotos, embora seja atualmente reconhecido que a função principal dessa polimerase seja a de revisão e reparo.

Em todas as células, a replicação pode ocorrer apenas a partir de um molde de fita simples de DNA (ssDNA). Portanto, devem existir mecanismos que têm como alvo os sítios de iniciação de replicação e que desenrolem o dsDNA naquela região. O complexo de replicação deve então se formar. Depois que a replicação está completa nessa área, as fitas parentais e filhas devem voltar a formar o dsDNA. Em células eucarióticas, uma etapa adicional precisa ocorrer. O dsDNA deve voltar a formar a estrutura de cromatina, incluindo os nucleossomos, que existiam antes do início da replicação. Embora todo esse processo não seja completamente compreendido em células eucarióticas, a replicação tem sido descrita com bastante precisão em células procarióticas, e os princípios gerais são os mesmos em ambas. As etapas principais estão listadas na **Tabela 35-4**, ilustradas na **Figura 35-13** e discutidas, em sequência, adiante. Algumas proteínas, a maioria com ação enzimática específica, estão envolvidas nesse processo **(Tabela 35-5)**.

A origem da replicação

Na **origem da replicação** (**ori**), há uma associação de proteínas de ligação de DNAds de sequência específica com uma série de sequências de DNA de repetição direta. Em bacteriófagos λ, a oriλ está ligada a uma proteína O, λ-codificada, em quatro sítios adjacentes. Na *E. coli*, o oriC está ligado pela proteína dnaA. Em ambos os casos, um complexo é formado, consistindo de 150 a 250 pb de DNA e multímeros de proteína ligada a DNA. Isto leva à desnaturação local e ao desenrolamento de uma região de DNA adjacente rica em A+T. **Sequências de replicação autônomas** (**ARS**) **ou replicadores**, funcionalmente semelhantes, foram identificados nas células de leveduras. As ARS contêm uma sequência um tanto degenerada de 11 pb chamada de **elemento de origem da replicação** (**ORE**). O ORE se liga a um conjunto de proteínas, análogas à proteína dnaA de *E. coli*, sendo o grupo de proteínas coletivamente chamado de **complexo de reconhecimento da origem** (**ORC**). Os homólogos ORC foram encontrados em todos os eucariotos examinados. O ORE está localizado adjacente a uma sequência rica em A+T de aproximadamente 80 pb, que é fácil de desenrolar. Isso é chamado de **elemento de desenrolamento do DNA** (**DUE**). O DUE é a origem da replicação em levedura e está ligado ao complexo de proteínas MCM.

Sequências de consenso com estrutura semelhante ao ori ou ARS não foram precisamente definidas nas células de mamíferos, embora várias das proteínas que participam no reconhecimento e na função de ori tenham sido identificadas e pareçam ser muito semelhantes aos seus congêneres de leveduras tanto na sequência quanto na função dos aminoácidos.

O desenrolamento do DNA

A interação de proteínas com o ori define o sítio de início da replicação e fornece uma região curta de ssDNA essencial para o início da síntese da fita de DNA nascente. Este processo requer a formação de algumas interações proteína-proteína e proteína-DNA. Uma etapa essencial é realizada por uma DNA-helicase

TABELA 35-4 Etapas envolvidas na replicação de DNA em eucariotos

1.	Identificação das origens da replicação
2.	Desenrolamento (desnaturação) do dsDNA para fornecer um molde de ssDNA
3.	Formação da forquilha de replicação; síntese do *primer* de RNA
4.	Iniciação da síntese de DNA e alongamento
5.	Formação de bolhas de replicação com a ligação dos segmentos de DNA recentemente sintetizados
6.	Reconstituição da estrutura de cromatina

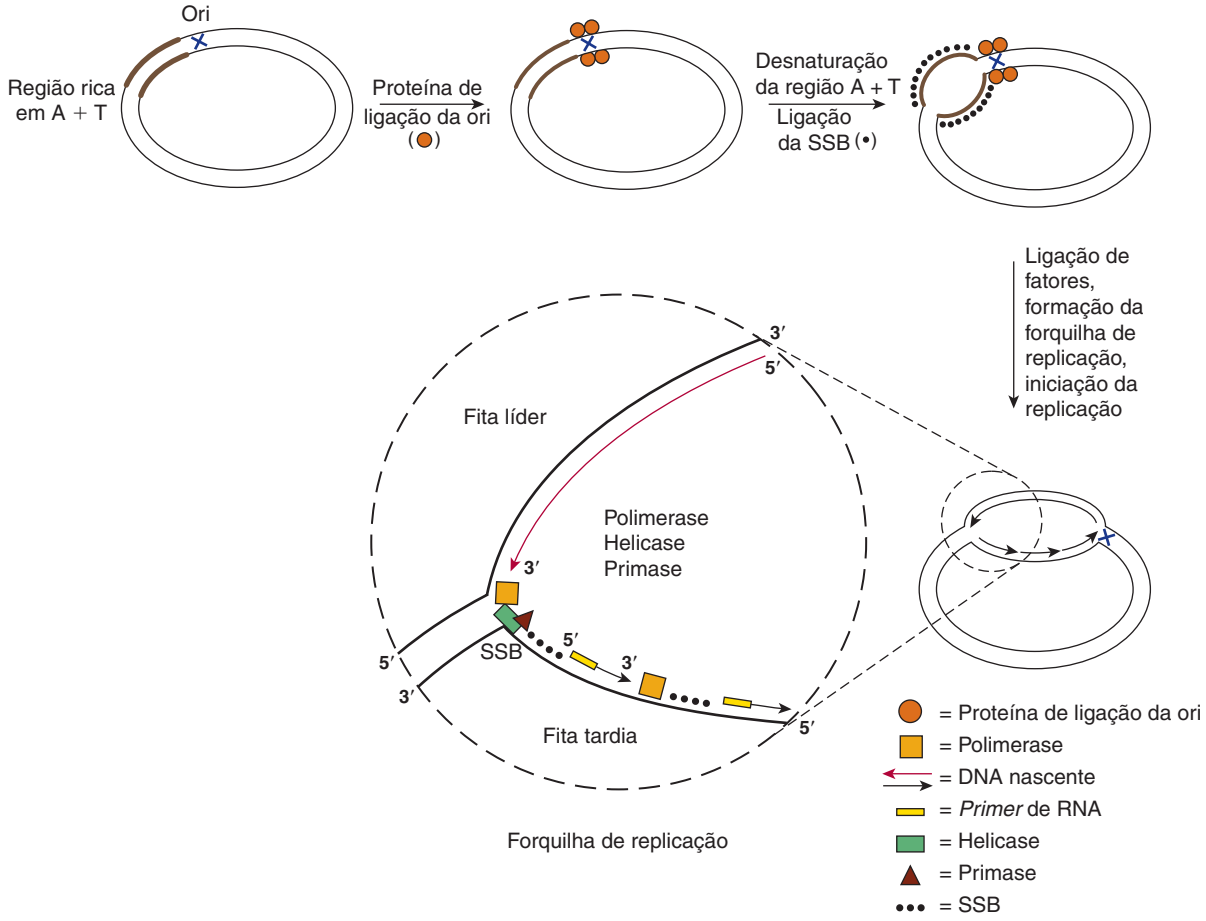


FIGURA 35-13 Etapas envolvidas na replicação de DNA. Esta figura descreve a replicação de DNA em uma célula de *E. coli*, mas as etapas gerais são semelhantes nos eucariotos. Uma interação específica de uma proteína (a proteína dnaA) para a origem da replicação (oriC) resulta em um desenrolamento local de DNA em uma região adjacente rica em A+T. O DNA nesta área é mantido em uma conformação de fita simples (ssDNA) por proteínas de ligação do DNA de fita simples (SSB). Isto permite a várias proteínas, incluindo a helicase, a primase e a DNA-polimerase, se ligarem e iniciarem a síntese de DNA. A forquilha de replicação procede à medida que a síntese de DNA ocorre continuamente (seta vermelha longa) na fita líder e descontinuamente (setas pretas pequenas) na fita tardia. O DNA nascente é sempre sintetizado na direção 5′ para 3′, uma vez que as DNA-polimerases podem adicionar nucleotídeos apenas à terminação 3′ de uma fita de DNA.

que permite o processo de desenrolamento do DNA. Em *E. coli* não infectadas, essa função é realizada por um complexo de dnaB helicases e pela proteína dnaC. As proteínas de ligação de DNA de fita simples (SSB) estabilizam esse complexo. Em uma *E. coli* infectada por fagos-λ, a proteína O do fago se liga à dnaB e o complexo P/dnaB se liga ao oriλ por interação com a proteína O. A dnaB não é uma helicase ativa quando está no complexo P/dnaB/O. Três proteínas de choque térmico de *E. coli* (dnaK, dnaJ e GrpE) cooperam para remover a proteína P e ativar a dnaB helicase. Em cooperação com a SSB, isso leva ao desenrolamento do DNA e à replicação ativa. Desse modo, a replicação do fago λ é realizada às custas da replicação da célula hospedeira de *E. coli*.

Formação da forquilha de replicação

A forquilha de replicação consiste em quatro componentes que se formam na seguinte sequência: (1) a DNA-helicase desenrola um segmento curto de um DNA dúplex parental; (2) uma primase inicia a síntese de uma molécula de RNA que é essencial para o *priming* da síntese de DNA; (3) a DNA-polimerase inicia a síntese da fita filha nascente; e (4) as SSB se ligam ao ssDNA e evitam a combinação prematura do ssDNA ao dsDNA. Essas reações estão ilustradas na Figura 35-13.

A enzima DNA-polimerase III (o produto do gene *dnaE* em *E. coli*) se liga ao molde de DNA como parte de um complexo multiproteico que consiste em vários fatores acessórios de polimerases (β, γ, δ, δ′ e τ). As DNA-polimerases apenas sintetizam o DNA na direção 5′ – 3′, e somente um dos vários tipos diferentes de polimerases está envolvido na forquilha de replicação. Como as fitas de DNA são antiparalelas (Capítulo 34), a polimerase funciona de forma assimétrica. Na **fita líder** (**para frente**) o DNA é sintetizado continuamente. Na **fita tardia** (**retrógrada**) o DNA é sintetizado em fragmentos curtos (1 a 5 kb; ver Figura 35-16), os chamados **fragmentos de Okazaki**. Vários fragmentos de Okazaki (até mil) devem ser sequencialmente sintetizados para cada forquilha de replicação. Para garantir que isto ocorra, a helicase atua na fita tardia para desenrolar o dsDNA na direção 5′–3′. A

TABELA 35-5 Classes de proteínas envolvidas na replicação

Proteína	Função
DNA-polimerases	Polimerização de desoxinucleotídeos
Helicases	Processa o desenrolamento do DNA
Topoisomerases	Libera a força de torção que resulta do desenrolamento induzido pela helicase
DNA-primase	Inicia a síntese dos *primers* de RNA
Proteínas de ligação do DNA de fita simples	Impede o reanelamento prematuro do dsDNA
DNA-ligase	Fecha o corte da fita simples entre a cadeia nascente e os fragmentos de Okazaki na fita tardia

TABELA 35-6 Uma comparação das DNA-polimerases de procariotos e eucariotos

E. coli	Eucariotos	Função
I		Preenchimento de lacunas após a replicação do DNA, reparo e recombinação
II		Revisão e reparo do DNA
	β	Reparo do DNA
	γ	Síntese do DNA mitocondrial
III	ε	Processividade, síntese da fita líder
DnaG	α	Primase
	δ	Processividade, síntese da fita tardia

helicase se associa à primase a fim de proporcionar o acesso adequado desta última ao molde. Isso permite que o *primer* de RNA seja feito e que, por sua vez, a polimerase inicie a replicação do DNA. Essa é uma sequência de reação importante, uma vez que as DNA-polimerases não podem iniciar a síntese de DNA novamente. O complexo móvel entre a helicase e a primase foi chamado de **primossomo**. À medida que a síntese de um fragmento de Okazaki se completa e a polimerase é liberada, um novo *primer* é sintetizado. A mesma molécula de polimerase permanece associada à forquilha de replicação e passa a sintetizar o novo fragmento de Okazaki.

O complexo DNA-polimerase

Algumas moléculas de DNA-polimerase estão envolvidas na replicação do DNA. Elas compartilham três propriedades importantes: (1) o **alongamento da cadeia**, (2) a **processividade** e (3) a **revisão**. O alongamento da cadeia é responsável pela razão (em nucleotídeos por segundo; nt/s) com que a polimerização ocorre. A processividade é uma expressão do número de nucleotídeos adicionados à cadeia nascente antes que a polimerase se separe do molde. A função de revisão é a identificação de erros nas cópias e sua subsequente correção. Na *E. coli*, a DNA-polimerase III (pol III) funciona na forquilha de replicação. De todas as polimerases, ela catalisa a maior taxa de alongamento de cadeia e é a mais ativa na processividade. Ela é capaz de polimerizar 0,5 Mb de DNA em um ciclo da fita líder. A pol III é um complexo de múltiplas subunidades de proteínas grandes (> 1 MDa). A DNA pol III se associa a duas subunidades β idênticas do "grampo" deslizante de DNA; esta associação aumenta dramaticamente a estabilidade do complexo de DNA pol III, a processividade (de 100 a mais de 50.000 nucleotídeos) e a taxa de alongamento da cadeia (de 20 a 50 nt/s), gerando o alto grau de processividade que a enzima apresenta.

As polimerases I (pol I) e II (pol II) estão envolvidas principalmente na revisão e no reparo do DNA. As células eucarióticas possuem congêneres para cada uma dessas enzimas, além de um grande número de polimerases adicionais envolvidas principalmente no reparo do DNA. A comparação é mostrada na **Tabela 35-6**.

Em células de mamíferos, a polimerase é capaz de polimerizar em um ritmo que é um pouco mais lento que a taxa de polimerização de nucleotídeos pelo complexo DNA-polimerase bacteriano. Esse ritmo diminuído pode ser o resultado da interferência de nucleossomos.

Início e alongamento da síntese de DNA

O início da síntese de DNA (**Figura 35-14**) necessita de um ***priming* por um RNA de comprimento curto**, de cerca de 10 a 200 nucleotídeos de comprimento. Na *E. coli*, isso é catalisado pela dnaG (primase), enquanto em eucariotos a DNA Pol sintetiza esses *primers* de RNA. O processo de *priming* envolve um ataque nucleofílico pelo grupo 3′-hidroxila do *primer* de RNA no fosfato do primeiro desoxinucleosídeo trifosfato que entra (*N* na Figura 35-14), com a quebra do pirofosfato; essa transição para a síntese de DNA é catalisada por DNA-polimerases adequadas (DNA pol III em *E. coli*; DNA pol δ e ε em eucariotos). O grupo 3′-hidroxila do recentemente ligado desoxirribonucleosídeo monofosfato fica então livre para realizar o **ataque nucleofílico** no próximo desoxirribonucleosídeo trifosfato que entrar (N + 1 na Figura 35-14), e mais uma vez no seu radical fosfato α, com a quebra do pirofosfato. É claro que a seleção do desoxirribonucleotídeo correto, cujo grupo terminal 3′-hidroxila será atacado, depende do **pareamento de bases adequado com a outra fita** da molécula de DNA de acordo com as regras propostas originalmente por Watson e Crick (**Figura 35-15**). Quando um radical adenina desoxirribonucleosídeo monofosforilado está na posição de molde, uma timidina trifosfato entrará e seu fosfato α será atacado pelo grupo 3′-hidroxila de desoxirribonucleosídeo monofosforilado mais recentemente adicionado ao polímero. Por esse processo em etapas, o molde determina qual desoxirribonucleosídeo trifosfato é complementar e, por meio de pontes de hidrogênio, o mantém em seu lugar enquanto o grupo 3′– hidroxila da fita em crescimento ataca e incorpora os novos nucleotídeos no polímero. Esses segmentos de DNA ligados a um componente de RNA iniciador são os **fragmentos de Okazaki** (**Figura 35-16**). Em mamíferos, após a geração de muitos fragmentos de Okazaki, o complexo de replicação começa a remover os *primers* de RNA fim de preencher as lacunas

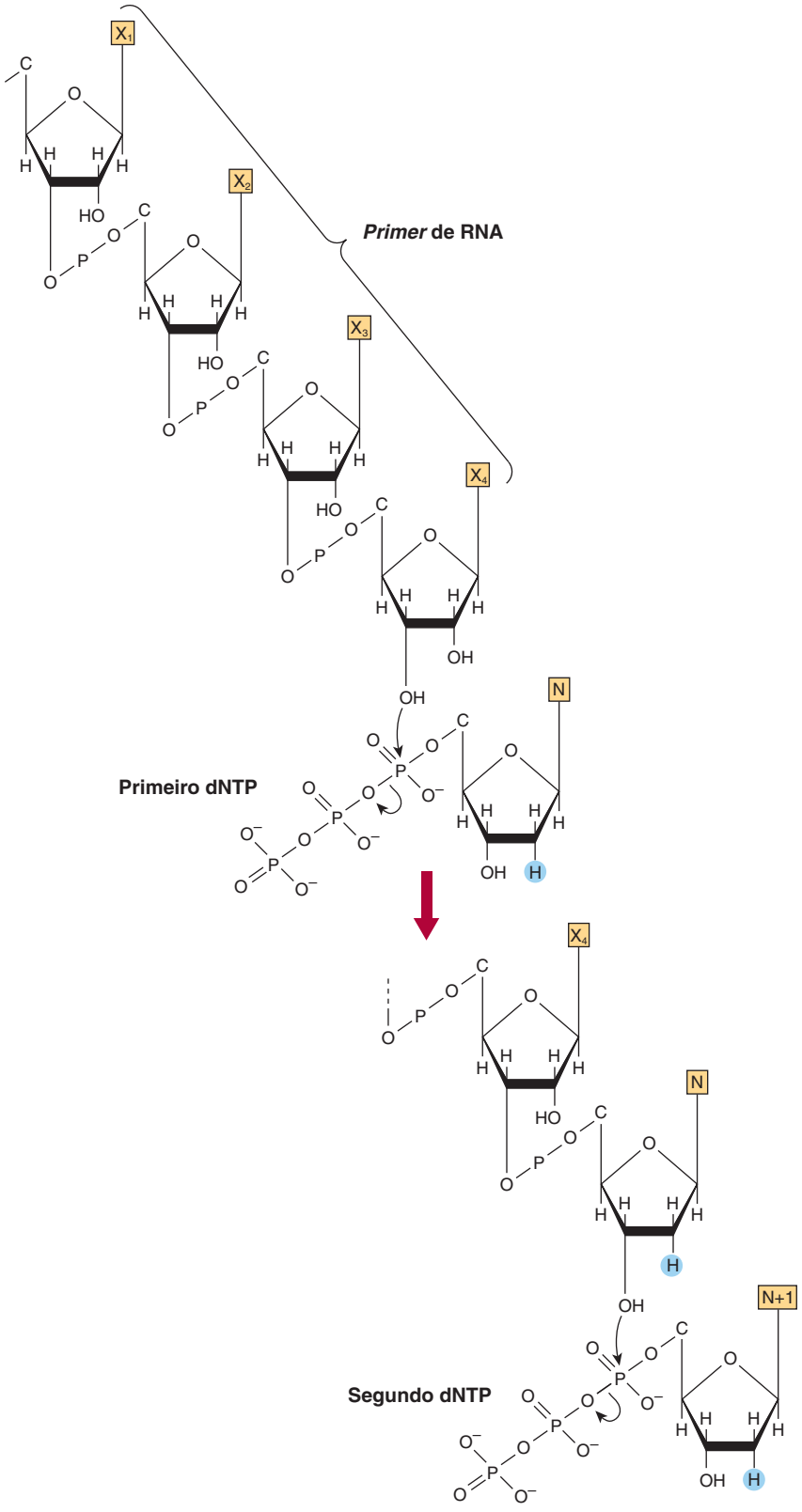


FIGURA 35-14 **O início da síntese de DNA a partir de um *primer* de RNA e a subsequente ligação do segundo desoxirribonucleosídeo trifosfato.**

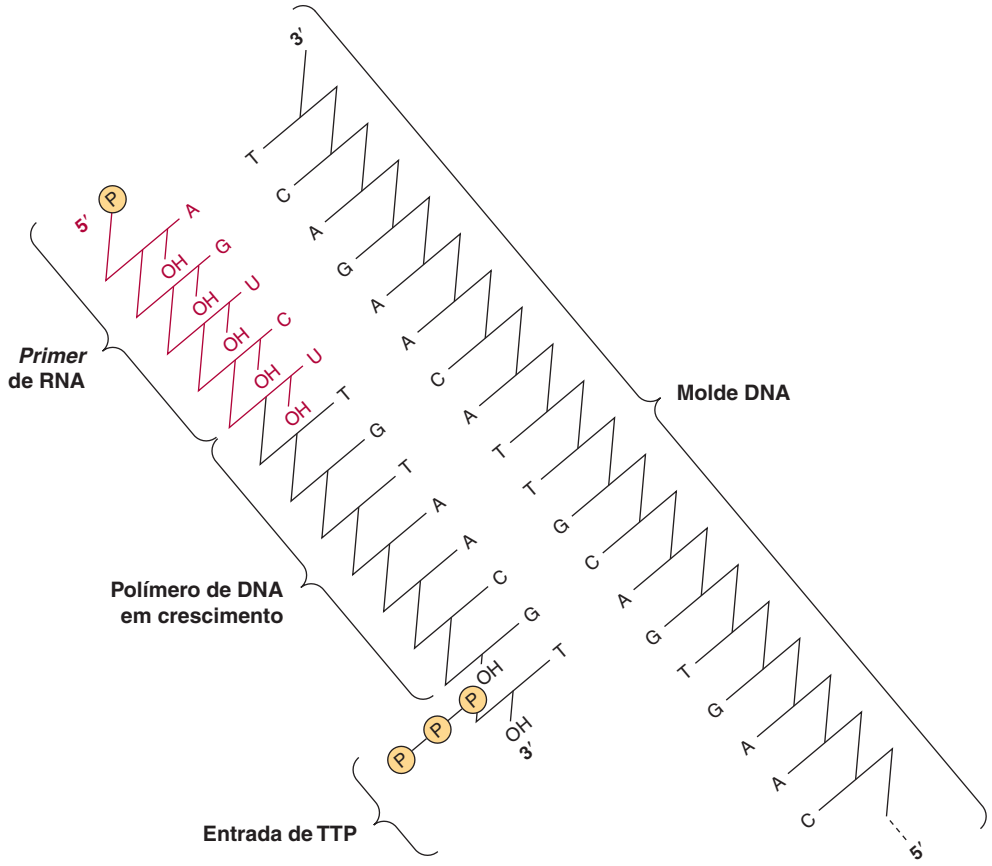


FIGURA 35-15 A síntese do DNA a partir do *primer* de RNA mostrando a função de molde da fita complementar do DNA parental.

deixadas por sua remoção com os pares de bases de desoxinucleotídeos adequados e, em seguida, religar os fragmentos do DNA recém-sintetizado, e, para que isso ocorra, são empregadas as enzimas chamadas de **DNA-ligases**.

A replicação exibe a polaridade

Como já foi mencionado, as moléculas de DNA são de fita dupla e as duas fitas são antiparalelas. A replicação do DNA em procariotos e eucariotos ocorre em ambas as fitas simultaneamente. Entretanto, uma enzima capaz de polimerizar o DNA na direção 3′ – 5′ não existe em nenhum organismo, de modo que ambas as fitas de DNA recém-duplicadas não podem crescer na mesma direção simultaneamente. Entretanto, a mesma enzima replica ambas as fitas ao mesmo tempo. A única enzima replica uma fita ("fita líder") de um modo contínuo na direção 5′ – 3′, com a mesma orientação geral para adiante. Ela replica a outra fita ("fita tardia") descontinuamente enquanto polimeriza os nucleotídeos em surtos curtos de 150 a 250 nucleotídeos, mais uma vez na direção 5′ – 3′, mas ao mesmo tempo está voltada para a extremidade traseira do *primer* de RNA precedente, em vez de voltada para a porção não replicada. Esse processo **semidescontínuo de síntese de DNA** é mostrado esquematicamente nas Figuras 35-13 e 35-16.

Formação de bolhas de replicação

A replicação ocorre a partir de um único ori no cromossomo circular bacteriano, composto por cerca de 5×10^6 pb de DNA. Esse processo se completa em cerca de 30 min, com uma taxa de replicação de 3×10^5 pb/min. O genoma completo de um mamífero replica em aproximadamente nove horas, o tempo médio necessário para a formação de um genoma tetraploide a partir de um

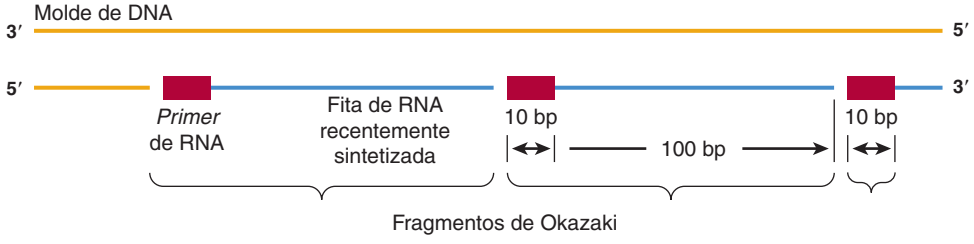


FIGURA 35-16 A polimerização descontínua de desoxirribonucleotídeos na fita tardia; a formação dos fragmentos de Okazaki durante a síntese de DNA na fita tardia é ilustrada. Os fragmentos de Okazaki têm de 100 a 250 nucleotídeos de comprimento em eucariotos e de 1.000 a 2.000 nucleotídeos em procariotos.

genoma diploide em uma célula replicadora. Se um genoma de mamífero (3×10^9 pb) fosse replicado na mesma proporção que o de uma bactéria (i.e., 3×10^5 bp/min), mas a partir de um único ori, a replicação levaria mais de 150 horas. Os organismos metazoários contornam esse problema usando duas estratégias. Primeiro, a replicação é bidirecional. Segundo, a replicação ocorre a partir de origens múltiplas em cada cromossomo (um total de até 100 em humanos). Assim, a replicação ocorre em ambas as direções ao longo de todos os cromossomos, e ambas as fitas são replicadas simultaneamente. Esse processo de replicação gera "**bolhas de replicação**" (**Figura 35-17**).

Os múltiplos sítios de ori que servem como origens para a replicação do DNA em eucariotos são pouco definidos, exceto em alguns vírus de animais e em leveduras. Entretanto, está claro que a iniciação é regulada tanto espacial quanto temporalmente, uma vez que grupos de sítios adjacentes iniciam a replicação simultaneamente. O disparo da replicação, ou o início da replicação do DNA em um replicador/ori, é influenciado por algumas propriedades distintas da estrutura da cromatina que estão apenas começando a ser compreendidas. É evidente, entretanto, que há mais replicadores e ORC em excesso do que o necessário para replicar o genoma de mamíferos no tempo de uma fase S típica. Portanto, devem existir mecanismos que controlem o excesso de replicadores ligados ao ORC. A compreensão do controle da formação e do disparo de complexos de replicação é um dos principais desafios nesse campo.

Durante a replicação do DNA, deve haver uma separação das duas fitas para permitir que cada uma sirva como um molde, pelas pontes de hidrogênio de suas bases de nucleotídeos aos desoxinucleosídeos trifosfato que entram. A separação da dupla-hélice de DNA é promovida por SSBs em *E. coli* e por uma proteína denominada proteína de replicação A (RPA) em eucariotos. Essas moléculas estabilizam a estrutura de fita simples à medida que a forquilha de replicação progride. As proteínas estabilizadoras se ligam cooperativa e estequiometricamente às fitas simples, sem interferir com as capacidades dos nucleotídeos de servirem como moldes (Figura 35-13).

Além de separar as duas fitas da dupla-hélice, deve haver um desenrolamento da molécula (uma vez a cada 10 pares de nucleotídeos) para permitir a separação das fitas. O complexo de proteína β de DNA hexamérico desenrola o DNA em *E. coli*, enquanto o complexo hexamérico MCM desenrola o DNA eucariótico. Esse desenrolamento acontece em segmentos adjacentes à bolha de replicação, e para que ele seja neutralizado, há muitos suportes giratórios intercalados nas moléculas de DNA de todos os organismos. A função do suporte giratório é realizada por enzimas específicas, que introduzem "**cortes**" **em uma fita da dupla-hélice desenrolada**, permitindo, assim, que o processo de desenrolamento aconteça. Os cortes são rapidamente religados sem a necessidade de fornecimento de energia, devido à formação de uma ponte covalente rica em energia entre o esqueleto de fosfodiéster cortado e a enzima religadora do corte. As enzimas religadoras de cortes são chamadas de **DNA-topoisomerases**. Esse processo é apresentado esquematicamente na **Figura 35-18** e lá comparado com a religação dependente de ATP realizada pelas DNA-ligases. As topoisomerases também são capazes de desenrolar o DNA super-helicoidal. O DNA super-helicoidal é uma estrutura de ordem superior que ocorre em moléculas de DNA circular enroladas em volta de um núcleo, como representado nas **Figuras 35-2** e **35-19**.

Em uma determinada espécie de vírus de animais (retrovírus), existe uma classe de enzimas capazes de sintetizar uma fita simples e, em seguida, uma molécula de dsDNA a partir de um molde de RNA de fita simples. Essa polimerase, DNA-polimerase dependente de RNA, ou "**transcriptase reversa**", primeiro sintetiza uma molécula híbrida de DNA-RNA utilizando o genoma de RNA como um molde. Uma nuclease codificadora específica de vírus, a **RNase H**, degrada o molde hibridizado de fita de RNA, e a fita de DNA restante, por sua vez, serve como um molde para formar uma molécula de dsDNA que contém a informação originalmente presente no genoma de RNA do vírus de animais.

Reconstituição da estrutura de cromatina

Há evidências de que a organização nuclear e a estrutura da cromatina estão envolvidas na determinação da regulação e no início da síntese de DNA. Como observado anteriormente, a frequência de polimerização em células eucarióticas, que possuem cromatina e nucleossomos, é mais lenta que em células procarióticas, que não possuem nucleossomos canônicos. É também claro que a estrutura de cromatina deve ser reformada após a replicação. O DNA recém replicado é rapidamente reunido em nucleossomos, e os octâmeros de histona preexistentes e recentemente reunidos são distribuídos aleatoriamente para cada braço da forquilha de

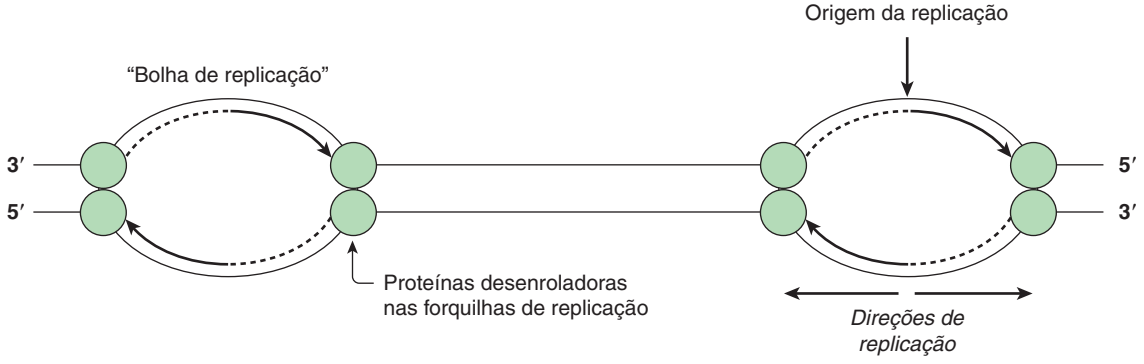


FIGURA 35-17 A geração de "bolhas de replicação" durante o processo de síntese de DNA. A replicação bidirecional e as posições esperadas das proteínas desenroladoras nas forquilhas de replicação são mostradas.

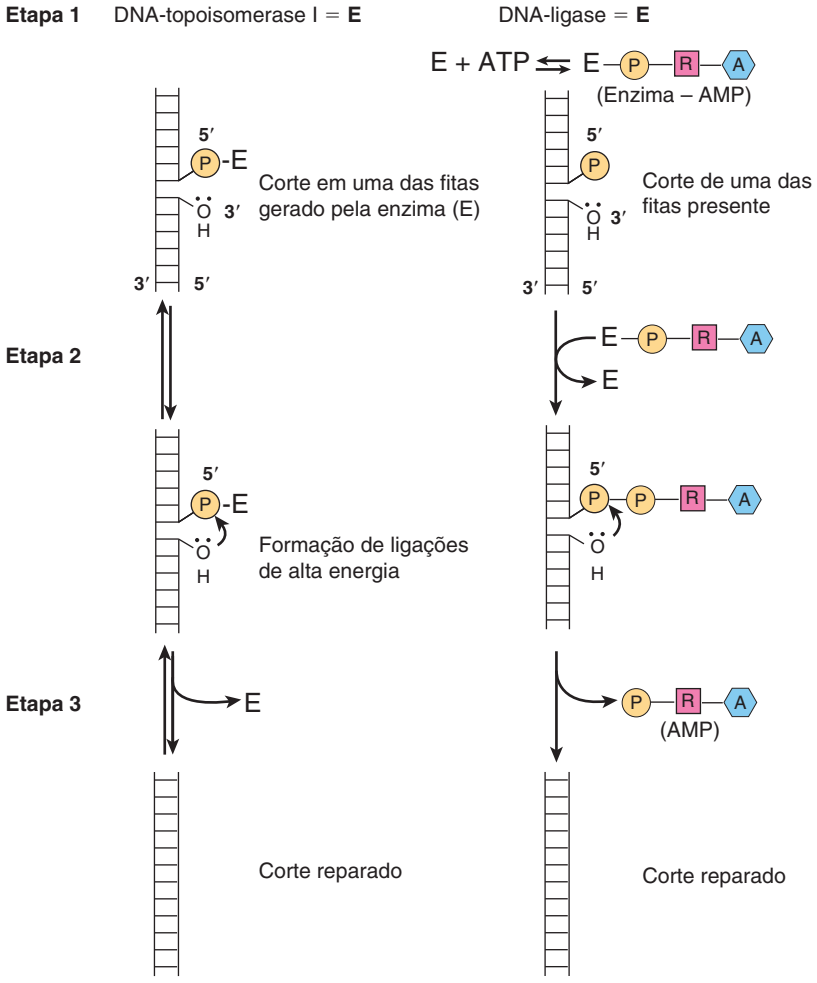


FIGURA 35-18 Comparação dos dois tipos de reações de corte-religação. A série de reações da esquerda é catalisada pela DNA-topoisomerase I, aquela da direita, pela DNA-ligase; P, fosfato; R, ribose; A, adenina. (Ligeiramente modificada e reproduzida com a permissão de Lehninger AL: *Biochemistry,* 2nd ed. Worth, 1975.Copyright c 1975 por Worth Publishers. Utilizada com a permissão de W. H. Freeman and Company).

replicação. Essas reações são facilitadas pelas ações das proteínas chaperonas de histonas trabalhando em conjunto com os complexos remodeladores de cromatina.

A síntese do DNA ocorre durante a fase S do ciclo celular

Em células animais, incluindo as células humanas, a replicação do genoma de DNA ocorre apenas em um tempo específico durante o período de vida da célula. Esse tempo é chamado de **síntese ou fase S**. Isso é muitas vezes temporalmente separado da **fase M ou mitótica**, por períodos sem síntese chamados de **fases *gap* 1** (G_1) e ***gap* 2** (G_2), que ocorrem antes e após a fase S, respectivamente (**Figura 35-20**). Entre outras ações, a célula se prepara para a síntese do DNA em G_1 e para a mitose em G_2. A célula regula o processo de síntese do DNA permitindo que ele ocorra apenas uma vez por ciclo celular e somente em tempos específicos nas células em preparação para a divisão mitótica.

Todas as células eucarióticas possuem produtos de genes que governam a transição de uma fase do ciclo celular para outra. As **ciclinas** são uma família de proteínas cujas concentrações aumentam e diminuem em tempos específicos, isto é, "passam por ciclos" durante o ciclo celular – daí o seu nome. As ciclinas ligam, no tempo certo, diferentes **proteinoquinases dependentes de ciclinas** (**CDK**) que fosforilam substratos essenciais para a progressão por meio do ciclo celular (**Figura 35-21**). Por exemplo, os níveis de ciclina D aumentam na fase tardia de G_1 e permitem a progressão para além do **ponto de início** (**levedura**) ou **ponto de restrição** (**mamíferos**), o ponto além do qual as células irrevogavelmente progridem para a fase S ou fase de síntese do DNA.

As ciclinas D ativam as CDK4 e CDK6. Essas duas quinases também são sintetizadas durante G_1 nas células que passam por divisão celular ativa. As ciclinas D e as CDK4 e CDK6 são proteínas nucleares que se reúnem como um complexo na fase G_1 tardia. O complexo é uma proteinoquinase serina-treonina ativa. Um substrato para essa quinase é a proteína do retinoblastoma (Rb). A Rb é uma reguladora do ciclo celular porque ela se liga e inativa um fator de transcrição (E2F) necessário para a transcrição de certos genes (genes de histona, proteínas de replicação de DNA, etc.) necessários para a progressão da fase G_1 para a fase S. A fosforilação de Rb por CDK4 ou CDK6 resulta na liberação de E2F a partir da repressão da transcrição mediada por Rb – assim, a ativação do gene acontece e a progressão do ciclo celular ocorre.

Outras ciclinas e CDKs estão envolvidas em diferentes aspectos da progressão do ciclo celular (**Tabela 35-7**). A ciclina E e a CDK2 formam um complexo na G_1 tardia. A ciclina E é rapidamente degradada, e a CDK2 liberada forma, em seguida, um complexo com a ciclina A. Essa sequência é necessária para a ini-

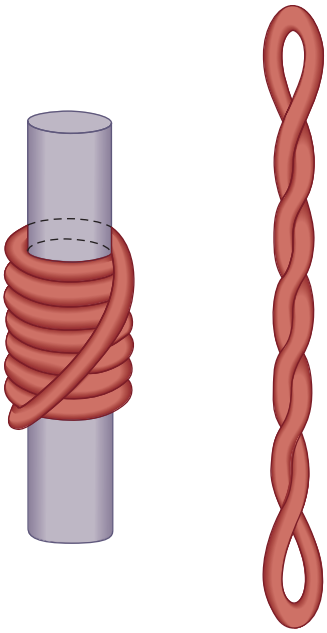


FIGURA 35-19 DNA super-helicoidal. Uma super-hélice toroidal (solenoidal) voltada para a esquerda será convertida em uma super-hélice voltada para a direita quando o núcleo cilíndrico for removido. Esta transição é análoga àquela que ocorre quando os nucleossomos são desfeitos pela extração de histonas da cromatina por meio da alta concentração de sais.

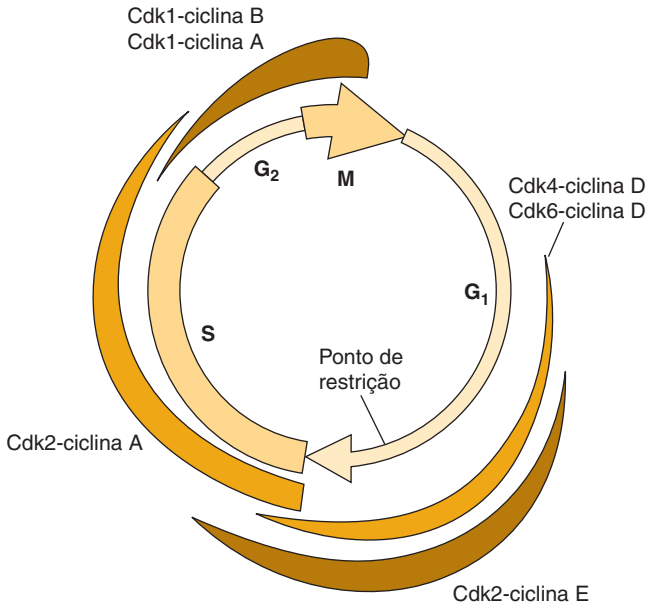


FIGURA 35-21 Ilustração esquemática dos pontos durante o ciclo celular de mamíferos, no qual as ciclinas indicadas e as quinases dependentes de ciclinas são ativadas. A espessura das várias linhas coloridas é indicativa do grau de atividade.

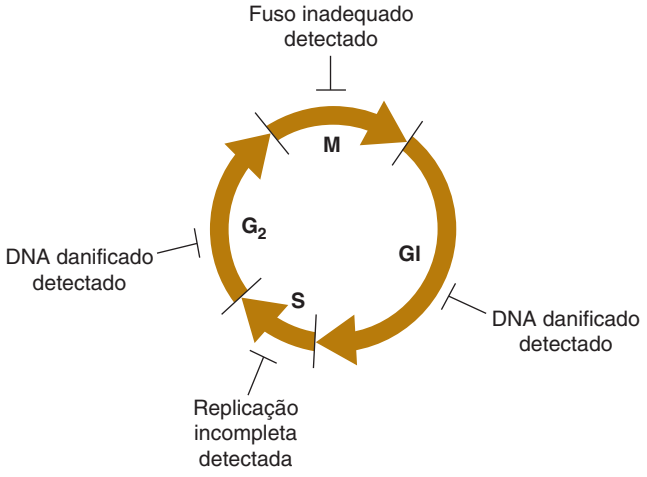


FIGURA 35-20 O progresso ao longo do ciclo celular de mamíferos é continuamente monitorado por múltiplos pontos de verificação no ciclo celular. O DNA, os cromossomos e a integridade da segregação cromossômica são continuamente monitorados por todo o ciclo celular. Se for detectado dano ao DNA tanto na fase G_1 quanto na G_2 do ciclo celular, se o genoma for replicado incompletamente ou se a maquinaria da segregação cromossômica normal for incompleta (i.e., um fuso defeituoso), as células não progredirão além da fase do ciclo em que os defeitos são detectados. Em alguns casos, se o dano não puder ser reparado, tais células passam pelo processo de morte celular programada (apoptose).

ciação da síntese de DNA na fase S. Um complexo entre a ciclina B e a CDK1 é o limitante da frequência para a transição de G_2/M nas células eucarióticas.

Muitos dos vírus causadores de câncer (oncovírus) e genes indutores de câncer (oncogenes) são capazes de atenuar ou interromper a aparente restrição que normalmente controla a passagem das células de mamíferos de G_1 para a fase S. A partir do exposto, pode-se supor que a produção em excesso de uma ciclina, a perda de um inibidor específico de CDK ou o tempo podem resultar em uma divisão celular anormal e irrestrita. Nesse contexto, é válido salientar que o oncogene *bcl* associado ao linfoma de células B parece ser o gene da ciclina D1. Do mesmo modo, as oncoproteínas (ou proteínas transformadoras), produzidas por vários vírus de DNA, têm por alvo inativar o repressor da transcrição de Rb, induzindo a divisão celular de maneira inadequada, enquanto a inativação de Rb, que em si é um gene supressor de tumor, leva ao crescimento celular descontrolado e à formação de tumores.

Durante a fase S, as células de mamíferos contêm quantidades maiores de DNA-polimerase que durante as fases não sintetizadoras do ciclo celular. Além disso, aquelas enzimas responsá-

TABELA 35-7 Ciclinas e quinases dependentes de ciclinas envolvidas na progressão do ciclo celular

Ciclina	Quinase	Função
D	CDK4, CDK6	Progressão além do limite do ponto de restrição G_1/S
E, A	CDK2	Início da síntese de DNA na fase S inicial
B	CDK1	Transição da fase G_2 para M

veis pela formação dos substratos para a síntese de DNA – isto é, desoxirribonucleosídeos trifosfatos– também aumentaram suas atividades, as quais diminuirão durante a fase de síntese até o reaparecimento do sinal para uma nova síntese de DNA. Durante a fase S, o **DNA nuclear é completamente replicado uma vez e apenas uma vez**. Parece que, assim que a cromatina tenha sido replicada, ela é marcada, de modo a evitar sua posterior replicação, até que ela passe novamente pela mitose. Esse processo é denominado licença de replicação. Os mecanismos moleculares para esse fenômeno parecem envolver a dissociação e/ou a fosforilação de ciclina/CKD e a degradação subsequente de várias proteínas ligadoras de origem que desempenham papéis cruciais na formação do complexo de replicação. Consequentemente, as origens disparam apenas uma vez por ciclo celular.

Em geral, um determinado par de cromossomos irá replicar simultaneamente no interior de uma porção fixa da fase S em cada replicação. Em um cromossomo, grupos de unidades de replicação replicam coordenadamente. A natureza dos sinais que regulam a síntese de DNA nesses níveis é desconhecida, mas a regulação parece ser uma propriedade intrínseca de cada cromossomo individual que é mediada por várias origens de replicação contidas nele.

Todos os organismos contêm elaborados mecanismos evolutivos conservados para reparar o DNA danificado

O reparo do DNA danificado é essencial para a manutenção da integridade genômica e, portanto, para impedir a propagação de mutações, tanto horizontalmente, isto é, mudanças nas sequências de DNA nas células somáticas, quanto verticalmente, em que lesões não reparadas estão presentes no DNA do espermatozoide ou oócito e, portanto, podem ser transmitidas à prole. O DNA está sujeito a uma grande variedade de agressões diárias por substâncias químicas, físicas e biológicas (**Tabela 35-8**) e, portanto, o reconhecimento e o reparo nas lesões do DNA são essenciais. Consequentemente, as células dos eucariotos contêm cinco vias de reparo de DNA principais, cada uma das quais contendo múltiplas proteínas, por vezes compartilhadas; essas proteínas de reparo do DNA contêm geralmente ortólogos em procarióticas. Os mecanismos de reparo do DNA incluem **Reparo por Excisão de Nucleotídeos**, **NER**; **Reparo de Malpareamento, MMR**; **Reparo por Excisão de Bases**, **BER**; **Recombinação Homóloga**, **HR**; e vias de reparo de **União de Extremidades não Homólogas**, **NHEJ (Figura 35-22)**. O experimento para testar a importância de muitas dessas proteínas de reparo para a biologia humana tem sido realizado pela natureza – mutações naturais em grande número desses genes que levam a doenças em humanos **(Tabela 35-9)**. Além disso, experimentos sistemáticos direcionados aos genes, com camundongos de laboratório, claramente também atribuíram a esses genes funções críticas de manutenção da integridade dos genes. Em estudos genéticos com camundongos, foi observado que, de fato, as mutações que tiveram esses genes como alvo induziram defeitos no reparo do DNA, enquanto, muitas vezes, também aumentaram muito a suscetibilidade ao câncer.

TABELA 35-8 Tipos de dano ao DNA

I. Alteração de uma única base
A. Despurinação
B. Desaminação da citosina à uracila
C. Desaminação da adenina à hipoxantina
D. Alquilação da base
E. Inserção ou deleção do nucleotídeo
F. Incorporação do análogo de uma base
II. Alteração de duas bases
A. Indução do dímero timina-timina (pirimidina) por luz ultravioleta
B. Agente alquilante bifuncional de ligação cruzada
III. Quebra da cadeia
A. Radiação ionizante
B. Desintegração radioativa do esqueleto estrutural da molécula
C. Formação de radicais livres oxidativos
IV. Ligações cruzadas
A. Entre bases da mesma fita ou de fitas opostas
B. Entre moléculas de DNA e proteínas (p. ex., histonas)

Um dos mecanismos mais intensivamente estudados de reparo do DNA é aquele utilizado para reparar as **quebras no DNA de dupla-hélice**, ou **DSB**; eles serão discutidos com algum detalhe aqui. Há duas vias, **HR** e **NHEJ**, que as células eucarióticas utilizam para remover DSB. A escolha entre as duas depende da fase do ciclo celular (Figuras 35-20 e 35-21) e do tipo exato de quebra de DSB que deve ser reparado (Tabela 35-8). Durante as fases G_0/G_1 do ciclo celular, as DSB são corrigidas pela via NHEJ, enquanto durante as fases do ciclo celular S e G_2/M, o HR é utilizado. Todas as etapas de reparo de dano do DNA são catalisadas por moléculas conservadas evolutivamente, que incluem **Sensores** de danos**, Transdutores** e **Mediadores** de reparo de danos**.** Coletivamente, essas cascatas de proteínas participam na resposta celular a danos ao DNA. De modo importante, os resultados celulares finais de dano ao DNA e das tentativas das células em reparar esses danos variam de **Atraso no Ciclo Celular**, para permitir o reparo do DNA, a **Parada do Ciclo Celular** para **Apoptose** ou **Senescência** (ver **Figura 35-23**; e mais detalhes adiante).

As moléculas envolvidas nesses processos complexos e altamente integrados variam desde histonas modificadas por danos específicos (i.e., Histona 4 dimetilada na lisina 20; H4K20me2) e variantes isotópicas de histonas tais como a histona **H2AX** (ver Tabela 35-1), a poli ADP-ribose polimerase (**PARP**), o complexo de proteínas MRN (subunidades de Mre11– Rad50-NBS1); às proteinoquinases de reconhecimento/sinalização ativadas por dano ao DNA [**ATM** (Ataxia Telangiectasia Mutante) e quinase relacionada à ATM, **ATR**, a proteinoquinase DNA – dependente com múltiplas subunidades (**DNA-PK e Ku70/80**) e quinases de pontos de verificação (quinases de ponto de verificação **CHK1 e CHK2**)]. Essas quinases múltiplas fosforilam e, consequentemente, modulam as atividades de dúzias de proteínas, como as numerosas proteínas reparadoras de DNA, controle de pontos de verificação (*checkpoint*), e proteínas de controle do ciclo celular como CDC25A, B, C, Wee1, p21, p16, e p19 [todas as reguladoras de ciclina-CDK (ver Figura 9-8; e a seguir); várias exo e endonucleases; proteínas de ligação específicas de fita simples DNA – DNA (RPA); PCNA e DNA-polimerases específicas (DNA pol delta, δ e eta, η)]. Muitas desses tipos de proteínas/enzimas foram discutidas anteriormente no contexto da replicação do DNA. O reparo do DNA e sua relação com o controle do ciclo celular constituem áreas muito ativas

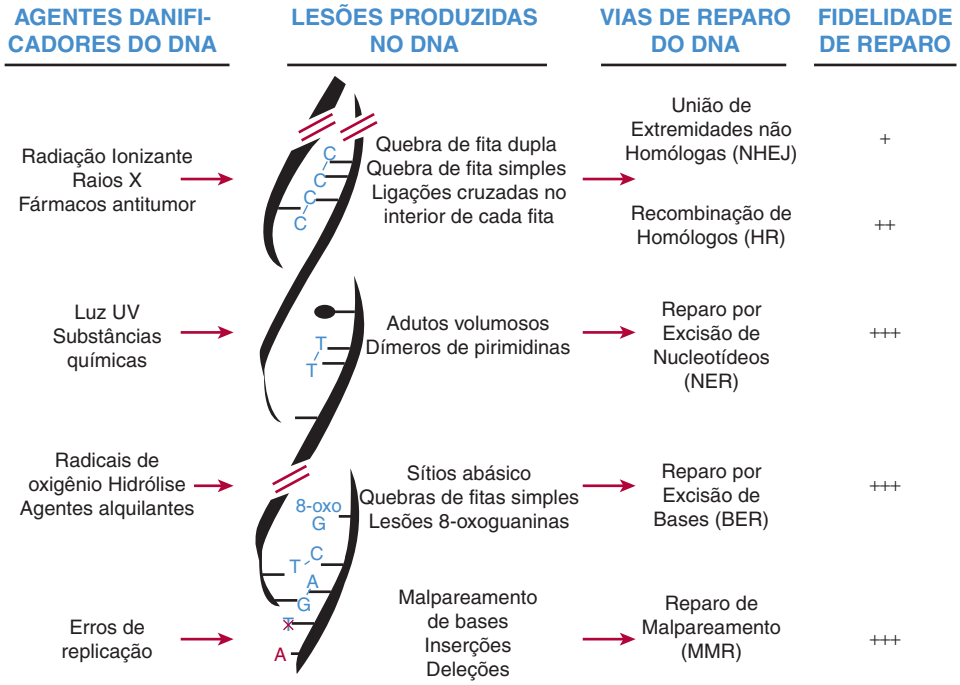


FIGURA 35-22 Os mamíferos utilizam múltiplas vias de reparo de DNA de precisão variável para reparar as miríades de formas de danos ao DNA às quais o DNA genômico se encontra sujeito. São listados os principais tipos de agentes danificadores do DNA, as lesões por eles produzidas (esquematizadas e listadas), a via de reparo de DNA responsável pelo reparo das diferentes lesões e a fidelidade relativa dessas vias. (Modificada com a permissão de: "DNA-Damage Response in Tissue– Specifi c and Cancer Stem Cells" *Cell Stem Cell* 8:16–29 (2011) copyright c 2011 Elsevier Inc).

de pesquisa devido aos seus papéis centrais na biologia celular e ao potencial para gerar prevenir o câncer.

A integridade do DNA e dos cromossomos é monitorada ao longo do ciclo celular

Dada a importância do DNA e do funcionamento cromossômico normais para a vida, não é de surpreender que as células eucarióticas tenham desenvolvido mecanismos elaborados para monitorar a integridade do material genético. Como detalhado anteriormente, alguns sistemas complexos de múltiplas subunidades de enzimas evoluíram para reparar o DNA danificado no nível da sequência de nucleotídeos. De modo semelhante, os acidentes do DNA no nível dos cromossomos também são monitorados e reparados. Como mostrado na Figura 35-20, tanto a integridade do DNA quanto a do cromossomo são continuamente monitoradas ao longo do ciclo celular. As quatro etapas específicas em que esse monitoramento ocorre foram chamadas **controles de pontos de verificação**. Se problemas são detectados em quaisquer desses pontos de verificação, a progressão pelo ciclo é interrompida e o trânsito pelo ciclo celular suspenso até o que o dano seja reparado. Os mecanismos moleculares subjacentes à detecção de danos no DNA durante as fases G_1 e G_2 do ciclo celular são melhor compreendidos do que aqueles que ocorrem durante as fases S e M.

A **proteína supressora de tumor p53**, uma proteína de PM (peso molecular) aparente 53 kDa na SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio), desempenha um papel fundamental em ambos os controles de pontos de verificação G_1 e G_2. Em geral uma proteína muito instável, a p53 é um fator de transcrição de ligação ao DNA, um **membro de uma família de proteínas relacionadas** (**i.e.**, **p53**, **p63 e p73**), que, de algum modo, se estabiliza em resposta ao dano ao DNA, provavelmente por interações diretas da p53 com o DNA. Como as histonas discutidas anteriormente, ela está sujeita a um arsenal de PTMs reguladoras, todas as quais provavelmente modificam suas múltiplas atividades biológicas. Níveis aumentados de p53 ativam a transcrição de um conjunto de genes que coletivamente atuam para retardar o trânsito por meio do ciclo. Uma dessas proteínas induzidas, a $p21^{CIP}$, é uma potente inibidora de CDK-ciclina (CKI) que é capaz de inibir de maneira eficaz a ação de todas as CDKs. Claramente, a inibição das CDKs irá interromper a progressão ao longo do ciclo celular (ver Figuras 35-19 e 35-20). Se o dano ao DNA é muito extenso

TABELA 35-9 Doenças humanas de reparo do DNA danificado

Reparo defeituoso da união de extremidades não homólogas (NHEJ)
Doença da imunodeficiência combinada severa (SCID)
Doença da Imunodeficiência combinada severa sensível à radiação (RS-SCID)
Reparo do homólogo defeituoso (HR)
Distúrbio semelhante à AT (ATLD)
Síndrome de quebra de Nijmegen (NBS)
Síndrome de Bloom (BS)
Síndrome de Werner (WS)
Síndrome de Rothmund thomson (RTS)
Suscetibilidade ao câncer de mama 1 e 2 (BRCA1, BRCA2)
Reparo defeituoso por excisão de nucleotídeos do DNA (NER)
Xerodermia pigmentosa (XP)
Síndrome de Cockaine (CS)
Tricotiodistrofia (TTD)
Reparo defeituoso por excisão de bases do DNA (BER)
Polipose associada à MUTYH (MAP)
Reparo defeituoso do malpareamento no DNA (MMR)
Câncer colorretal hereditário não poliposo (HNPCC)

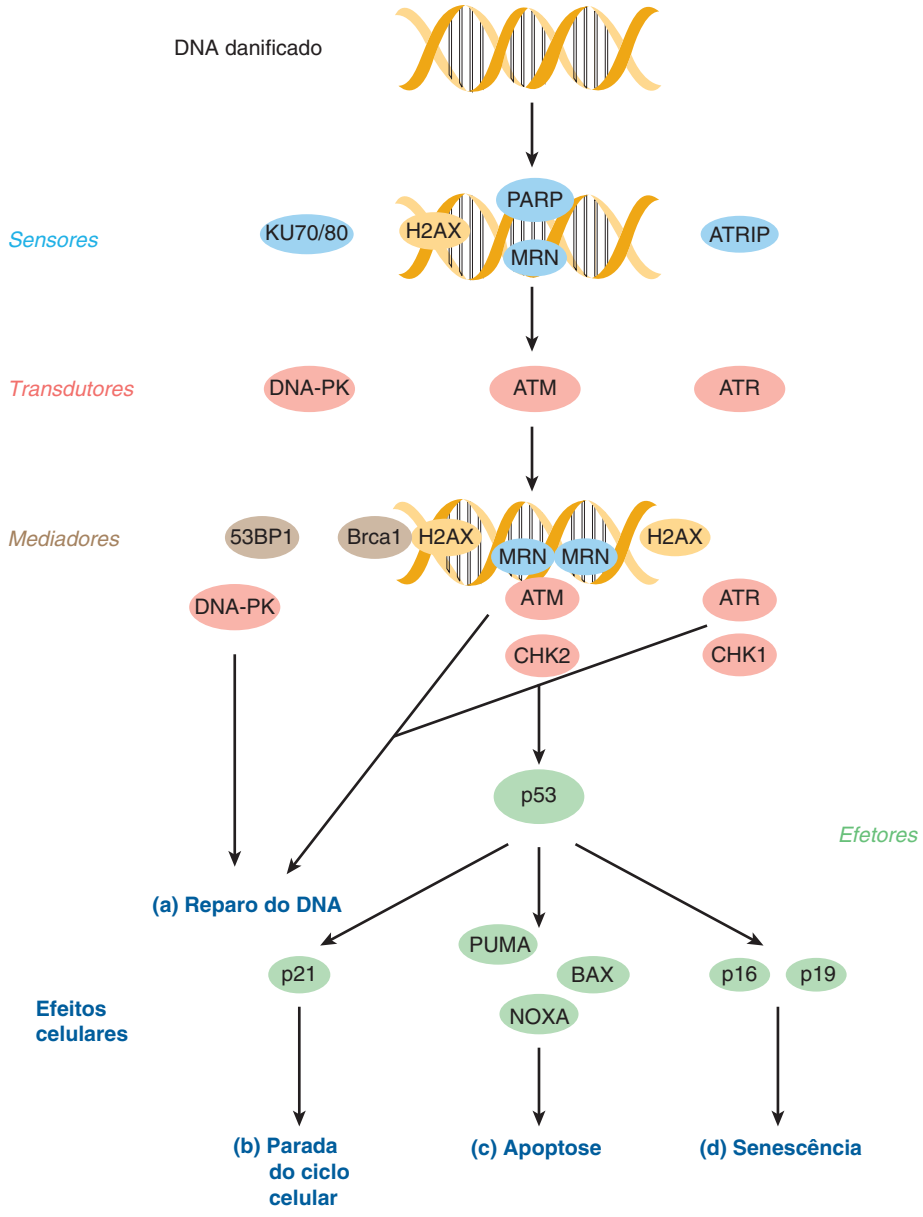


FIGURA 35-23 O mecanismo de múltiplas etapas do reparo da quebra da fita dupla de DNA. São mostradas de cima para baixo as proteínas (complexos proteicos) que: identificam DSB no DNA genômico (Sensores), fazem a transdução e amplificam o dano identificado no DNA (Transdutores e Mediadores), bem como as moléculas que determinam os resultados finais da resposta ao dano no DNA (Efetores). O DNA danificado pode ser: (a) reparado diretamente (reparo de DNA), ou, por vias mediadas pela p53 e, dependendo do grau de gravidade da lesão no DNA, por genes induzidos ativados pela p53, (b) as células podem ter o seu ciclo celular parado pelo p21/WAF1, o potente inibidor do complexo CDK--ciclina, a fim de obter tempo para que o DNA extensamente danificado possa ser reparado, ou (c) e (d) se a extensão da lesão do DNA for grande demais para ser reparada, as células podem ou entrar em apoptose ou em senescência. Ambos os processos impedem que as células que contêm o DNA danificado se dividam e, portanto, possam induzir o câncer ou outros resultados biológicos deletérios (Com base em: "DNA Damage Response in Tissue-Specific and Cancer Stem Cells" *Cell Stem Cell* 8:16–29 (2011) copyright © 2011 Elsevier Inc).

para ser reparado, as células afetadas sofrem **apoptose** (morte celular programada) de um modo dependente da p53. Nesse caso, a p53 induz a ativação de um conjunto de genes que induz a apoptose. As células sem p53 funcional não conseguem sofrer apoptose em resposta a níveis elevados de radiação ou a agentes quimioterápicos ativadores do DNA. Não é de surpreender, então, que o *p53* seja um dos mais frequentes genes mutantes em cânceres humanos. Na verdade, estudos recentes de sequenciamento genômico de múltiplas amostras de DNA de tumores sugerem que mais de 80% dos cânceres humanos contêm mutações de perda de função da p53. Pesquisas adicionais sobre os mecanismos de controle dos pontos de verificação serão extremamente valiosos no desenvolvimento de opções terapêuticas efetivas contra o câncer.

RESUMO

- O DNA nas células eucarióticas está associado a uma variedade de proteínas, resultando em uma estrutura chamada de cromatina.
- A maior parte do DNA está associada a proteínas histonas para formar uma estrutura chamada de nucleossomo. Os nucleossomos são compostos de um octâmero de histonas em volta do qual está enrolado o DNA de cerca de 150 pb.
- As histonas estão sujeitas a um amplo conjunto de modificações covalentes dinâmicas que possuem consequências reguladoras importantes.
- Os nucleossomos e as estruturas de ordem superior formadas a partir deles servem para compactar o DNA.
- O DNA em regiões transcricionalmente ativas é relativamente mais sensível ao ataque de nucleases *in vitro*; algumas regiões, assim chamadas de sítios hipersensíveis são excepcionalmente sensíveis e nelas são frequentemente encontrados sítios de controle de transcrição.
- O DNA muito ativo transcricionalmente (genes) está frequentemente agrupado em regiões de cada cromossomo. No interior dessas regiões, os genes podem ser separados por DNA inativo nas estruturas dos nucleossomos. Em eucariotos, a unidade de transcrição – a porção de um gene que é copiada pela RNA-polimerase – frequentemente consiste na codificação de regiões do DNA (éxons) interrompidas por sequências intervenientes de DNA não codificante (íntrons).
- Após a transcrição, durante o processamento do RNA, os íntrons são removidos e os éxons são ligados em conjunto para formar o mRNA maduro que aparece no citoplasma; este processo é chamado de *splicing* do RNA.
- O DNA em cada cromossomo é replicado exatamente de acordo com as regras de pareamento de bases durante a fase S do ciclo celular.
- Cada fita da dupla-hélice é replicada simultaneamente, mas por mecanismos um pouco diferentes. Um complexo de proteínas, incluindo a DNA-polimerase, replica a fita líder continuamente na direção 5′ – 3′. A fita tardia é replicada de modo descontínuo, em pequenos pedaços de 150 a 250 nucleotídeos, em uma direção 3′-5′.
- A replicação do DNA se inicia em sítios especiais, denominados origens ou oris, e produz bolhas de replicação. Cada cromossomo possui múltiplas origens. Todo o processo leva cerca de nove horas em uma célula humana típica e ocorre apenas durante a fase S do ciclo celular.
- Vários mecanismos que empregam diferentes sistemas enzimáticos reparam o DNA celular danificado após a exposição das células a mutagênicos químicos e físicos.

REFERÊNCIAS

Blanpain C, Mohrin M, Sotiropoulou PA, et al: DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells. Cell Stem Cell 2011;8:16–29.

Bohgaki T, Bohgaki M, Hakem R: DNA double-strand break signaling and human disorders. Genome Integr 2010;1:15–29.

Campos EL, Fillingham J, Li G, et al: The program for processing newly synthesized histones H3.1 and H4. Nat Struct Mol Biol 2010;17:1343–1351.

Campos EL, Reinberg D: Histones: annotating chromatin. Annu Rev Genet 2009;43:559–599.

Dalal Y, Furuyama T, Vermaak D, et al: Structure, dynamics, and evolution of centromeric nucleosomes. Proc Nat Academy of Sciences 2007;104:41.

Deng W, Blobel GA: Do chromatin loops provide epigenetic gene expression states? Curr Opin Genet Develop 2010;20:548–554.

Encode Consortium: Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. Nature 2007;447:799.

Gilbert DM: In search of the holy replicator. Nature Rev Mol Cell Biol 2004;5:848.

Hakem R: DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. EMBO J 2008;27:589–605.

Johnson A, O'Donnell M: Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. Ann Rev Biochemistry 2005;74:283.

Krishnan KJ, Reeve AK, Samuels DC, et al: What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? Nat Genet 2008;40:275.

Lander ES, Linton LM, Birren B, et al: Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001;409:860.

Luger K, Mäder AW, Richmond RK, et al: Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. Nature 1997;389:251.

Margueron R, Reinberg D: Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. Nat Rev Genet 2010;11:285–296.

Misteli T: Beyond the sequence: cellular organization of genome function. Cell 2007;128:787.

Misteli T, Soutoglou E: The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. Nat Rev Mol Cell Biol 2010;10:243–254.

Orr HT, Zoghbi, HY: Trinucleotide repeat disorders. Annu Rev Neurosci 2007;30:375.

Ponicsan SL, Kugel JF, Goodrich JA: Genomic gems: SINE RNAs regulate mRNA production. Curr Opin Genet Develop 2010; 20:149–155.

Sullivan, Blower MD, Karpen GH: Determining centromere identity: cyclical stories and forking paths. Nat Rev Genet 2001; 2:584.

Takizawa T, Meaburn KJ, Misteli T: The meaning of gene positioning. Cell 2008;135:9–13.

Talbert PB, Henikoff S: Histone variants–ancient wrap artists of the epigenome. Nat Rev Mol Cell Biol 2010;11:264–275.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al: The sequence of the human genome. Science 2002;291:1304.

Zaidi SK, Young DW, Montecino MA, et al: Mitotic bookmarking of genes: a novel dimension to epigenetic control. Nat Rev Genet 2010;11:583–589.

Zilberman D, Henikoff S: Genome wide analysis of DNA methylation patterns. Development 2007;134:3959.

CAPÍTULO

36

Síntese, Processamento e Modificação do RNA

P. Anthony Weil, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever as moléculas envolvidas e o mecanismo da síntese do RNA.
- Explicar como as RNA-polimerases dependentes de DNA de eucariotos, em colaboração com um conjunto de fatores acessórios específicos, podem transcrever diferencialmente o DNA genômico para produzir moléculas precursoras de mRNA específicas.
- Caracterizar a estrutura dos precursores de mRNA de eucariotos, que são muito modificados em ambas as terminações.
- Avaliar o fato de que a maioria dos genes codificadores de mRNA de mamíferos são interrompidos por múltiplas sequências que não codificam proteínas, denominadas íntrons, que são intercaladas entre regiões codificadoras de proteínas chamadas de éxons.
- Elucidar que uma vez que o íntron de RNA não codifica proteínas, o RNA intrônico deve ser removido especifica e precisamente de modo a gerar mRNA funcionais a partir das moléculas precursoras de mRNA, em uma série de eventos moleculares precisos denominados de *splicing* do RNA.
- Detalhar as etapas e as moléculas que catalisam o *splicing* de mRNA, um processo que converte as moléculas precursoras de mRNA com terminações modificadas em mRNA que são funcionais para a tradução.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A síntese de uma molécula de RNA a partir do DNA é um processo complexo que envolve uma enzima do grupo das RNA-polimerases e algumas proteínas associadas. As etapas gerais necessárias para sintetizar o transcrito primário são iniciação, alongamento e terminação. A mais conhecida é a iniciação. Algumas regiões do DNA (geralmente localizadas acima do sítio de iniciação) e fatores proteicos que se ligam a essas sequências para regular a iniciação da transcrição foram identificados. Certos RNA – mRNA em particular – possuem tempos de vida muito diferentes em uma célula. As moléculas de RNA sintetizadas nas células de mamíferos são compostas como moléculas precursoras que devem ser processadas em RNA ativos maduros. É importante entender os princípios básicos da síntese e do metabolismo do RNA mensageiro (mRNA), para que a modulação desse processo resulte em taxas alteradas de síntese de proteínas e, portanto, em uma variedade tanto de mudanças metabólicas quanto fenotípicas. Essa é a forma pela qual todos os organismos se adaptam às mudanças do ambiente. É também como são estabelecidas e mantidas as estruturas e funções celulares diferenciadas. Erros ou mudanças na síntese, no processamento, no *splicing*, na estabilidade ou na função das transcrições de mRNA podem ser causas de doenças.

O RNA EXISTE EM QUATRO CLASSES PRINCIPAIS

Todas as células eucarióticas possuem quatro classes principais de RNA (**Tabela 36-1**): RNA ribossomal (rRNA), mRNA, RNA de transferência (tRNA) e os pequenos RNA, os pequenos RNAs nucleares e os microRNAs (snRNA e miRNA). Os primeiros três estão envolvidos na síntese de proteínas, enquanto os RNAs pequenos estão envolvidos no *splicing* de mRNA e modulação da expressão de genes por meio da alteração da função do mRNA.

TABELA 36-1 Classes de RNA de eucariotos

RNA	Tipos	Abundância	Estabilidade
Ribossomal (rRNA)	28S, 18S, 5,8S, 5S	80% do total	Muito estável
Mensageiro (mRNA)	~10^5 Espécies diferentes	2 a 5% do total	Instável a muito estável
Transportador (tRNA)	~60 Espécies diferentes	~15% do total	Muito estável
Pequenos RNA			
Pequeno nuclear (snRNA)	~ 30 Espécies diferentes	≤ 1% do total	Muito estável
Micro (miRNA)	100s a 1.000	< 1% do total	Estável

As várias classes de RNA são diferentes em sua diversidade, estabilidade e abundância nas células.

O RNA É SINTETIZADO A PARTIR DE UM MOLDE DE DNA POR UMA RNA-POLIMERASE

Os processos de síntese de DNA e RNA são semelhantes porque envolvem (1) as etapas gerais de iniciação, alongamento e terminação com polaridade 5′–3′; (2) complexos de iniciação grandes e com múltiplos componentes; e (3) fidelidade às regras de pareamento de bases de Watson e Crick. Entretanto, as sínteses de DNA e RNA são diferentes em vários aspectos importantes, incluindo os seguintes: (1) os ribonucleotídeos são utilizados na síntese do RNA, em vez de desoxirribonucleotídeos; (2) U substitui T como a base complementar para A no RNA; (3) um *primer* não está envolvido na síntese do RNA uma vez que as RNA-polimerases possuem a capacidade para iniciar a síntese "de novo"; (4) apenas partes do genoma são vigorosamente transcritas ou copiadas em RNA, enquanto todo o genoma deve ser copiado, uma vez e apenas uma vez durante a replicação do DNA; e (5) não há função de revisão eficaz e altamente ativa durante a transcrição do RNA.

O processo de síntese de RNA a partir de um molde de DNA foi mais bem caracterizado em procariotos. Embora nas células de mamíferos a regulação da síntese do RNA e o processamento das transcrições de RNA sejam diferentes daqueles nos procariotos, o processo de síntese de RNA em si é muito semelhante nessas duas classes de organismos. Portanto, a descrição da síntese de RNA em procariotos, nos quais é mais bem compreendida, é aplicável a eucariotos, embora as enzimas envolvidas, e os sinais reguladores, ainda que relacionados, sejam diferentes.

A fita-molde de DNA é transcrita

A sequência de ribonucleotídeos em uma molécula de RNA é complementar à sequência de desoxirribonucleotídeos em uma fita da molécula de fita dupla de DNA (Figura 34-8). A fita que é transcrita ou copiada em uma molécula de RNA é chamada de **fita-molde** do DNA. A outra fita de DNA, a **fita não molde**, é frequentemente chamada de **fita codificadora** daquele gene. É chamada assim porque, com exceção da troca de T por U, ela corresponde exatamente à sequência do RNA mensageiro primário transcrito, que codifica a proteína (produto) do gene. No caso de uma molécula de fita dupla de DNA que contém muitos genes, a fita-molde para cada gene não será necessariamente a mesma fita do DNA de dupla-hélice **(Figura 36-1)**. Assim, uma determinada fita de uma molécula de fita dupla de DNA servirá de fita-molde para alguns genes e de fita codificadora para outros genes. Observe que a sequência de nucleotídeos de uma transcrição de RNA será a mesma (exceto para U substituindo T) que a da fita codificadora. A informação na fita-molde é lida na direção 3′-5′. Embora não seja mostrado na Figura 36-1, há exemplos de genes incorporados no interior de outros genes.

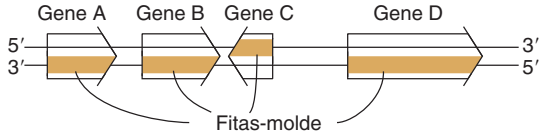


FIGURA 36-1 Genes podem ser transcritos a partir de ambas as fitas de DNA. As pontas das setas indicam a direção de transcrição (polaridade). Observe que a fita-molde sempre é lida na direção 3′-5′. É chamada de fita codificadora porque ela é idêntica (exceto pela troca de T por U) à transcrição do mRNA (transcrição primária em células eucarióticas) que codifica o produto de proteína do gene.

A RNA-polimerase dependente de DNA inicia a transcrição em um sítio distinto, o promotor

A RNA-polimerase dependente de DNA é a enzima responsável pela polimerização de ribonucleotídeos em uma sequência complementar à fita-molde do gene (ver **Figuras 36-2** e **36-3**). A enzima se liga a um sítio específico – o promotor – na fita-molde. Segue-se o início da síntese de RNA no ponto de partida, e o processo continua até que uma sequência de terminação seja alcançada (Figura 36-3). Uma **unidade de transcrição** é definida como aquela região do DNA que inclui os sinais para o início da transcrição, alongamento e terminação. O produto de RNA, que é sintetizado na direção 5′–3′, é o **transcrito primário**. As taxas de transcrição variam de gene para gene, mas podem ser muito elevadas. Uma micrografia eletrônica da transcrição em ação é apresentada na **Figura 36-4**. Em procariotos, ela pode representar o produto de vários genes contíguos; em células de mamíferos, ela, em geral, representa o produto de um único gene. Se a unidade de transcrição contém apenas um único gene, os terminais 5′ do transcrito do RNA primário e do RNA citoplasmático maduro são idênticos. **Assim, o ponto de partida da transcrição corresponde ao nucleotídeo 5′ do mRNA**. Ele é chamado de posição +1, assim como o nucleotídeo correspondente no DNA. Os números aumentam à medida que a sequência prossegue *a jusante* (*downstream*) do ponto de partida. Essa convenção facilita a localização de regiões específicas, tais como as fronteiras dos íntrons e éxons. O nucleotídeo no promotor adjacente ao sítio de início da transcrição fita acima é chamado de –1, e esses números negativos aumentam à medida que a sequência segue *a montante* (*upstream*) e se afasta do ponto de início. Esse sistema de numeração +/– fornece um modo convencional de definir a localização de elementos reguladores no promotor.

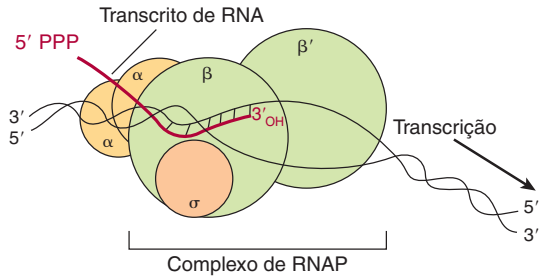


FIGURA 36-2 A RNA-polimerase (RNAP) catalisa a polimerização de ribonucleotídeos em uma sequência de RNA que é complementar à fita-molde do gene. O transcrito de RNA tem a mesma polaridade (5′-3′) que a fita codificadora e contém U em vez de T. A RNAP de *E. coli* consiste em um complexo nuclear de duas subunidades α e duas subunidades β (β e β′). A holoenzima contém a subunidade σ ligada ao conjunto α_2, β β′ do núcleo da enzima. A subunidade ω não é mostrada. A "bolha" de transcrição é uma área de aproximadamente 20-pb de DNA com a fita dupla desfeita, e o complexo inteiro cobre de 30 a 75pb, dependendo da conformação da RNAP.

Os transcritos primários gerados pela RNA-polimerase II – uma das três RNA-polimerases DNA dependentes com núcleo distinto em eucariotos – são rapidamente revestidos por capuzes de trifosfato de 7-metil-guanosina (Figura 34-10) que persistem e, por fim, aparecem na terminação 5′ do mRNA citoplasmático maduro. Esses capuzes são necessários para o processamento subsequente do transcrito primário em mRNA, para a tradução do mRNA e para a proteção do mRNA do ataque exonucleolítico.

A RNA-polimerase bacteriana dependente de DNA é uma enzima de múltiplas subunidades

A RNA-polimerase dependente de DNA (RNAP) da bactéria *Escherichia coli* existe como um complexo nuclear de aproximadamente 400 kDa, consistindo em duas subunidades α idênticas, subunidades β e β′ semelhantes, mas não idênticas, e uma subunidade ω. A subunidade β se liga aos íons de Mg^{2+} e compõe a subunidade catalítica (Figura 36-2). O núcleo da RNA-polimerase nuclear, $\beta\beta'\alpha_2\omega\sigma$, frequentemente denominado de E, se associa a um fator de proteína específico (o fator sigma [σ]) para formar a holoenzima $\beta\beta'\alpha_2\omega\sigma$, ou Eσ. A subunidade σ auxilia a enzima nuclear a reconhecer e a se ligar à sequência de desoxinucleotídeos específica da região promotora **(Figura 36-5)** para formar o **complexo de pré-iniciação (PIC)**. Há múltiplos genes codificadores de fatores σ distintos em todas as espécies de bactérias. Os fatores sigma possuem uma função dupla no processo de reconhecimento do promotor; a associação de σ ao núcleo da RNA-polimerase diminui sua afinida-

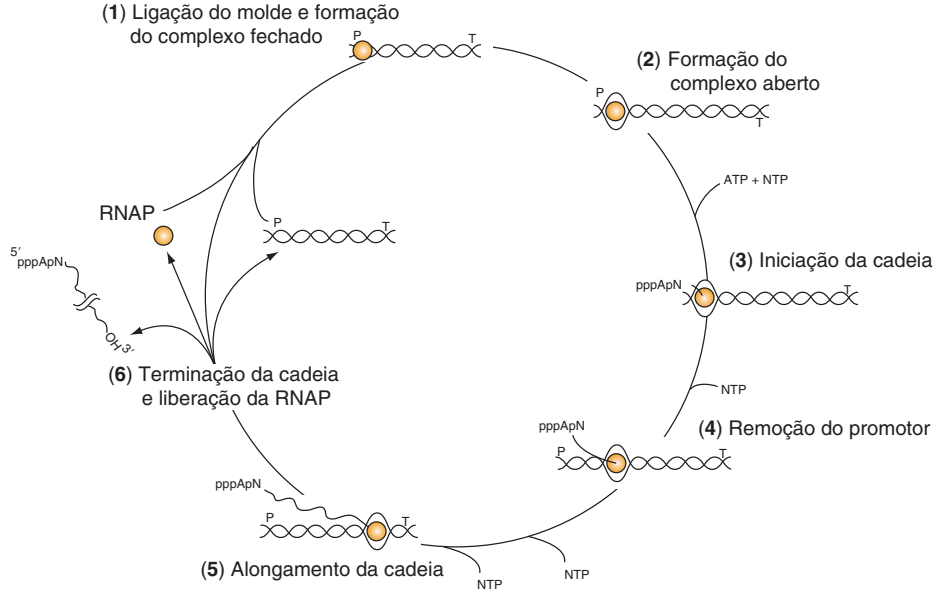


FIGURA 36-3 O ciclo de transcrição. A transcrição pode ser descrita em seis etapas: (**1**) **ligação ao molde e formação do complexo RNA-polimerase-promotor fechado**: a RNA-polimerase (RNAP) se liga ao DNA e então localiza um promotor (**P**), (**2**) **formação do complexo promotor aberto**: uma vez ligada ao promotor, a RNAP separa as duas fitas de DNA para formar um complexo promotor aberto; esse complexo também é chamado de complexo pré-iniciação ou PIC. A separação das fitas permite que a polimerase acesse a informação codificadora na fita-molde de DNA. (**3**) **Iniciação da cadeia**: usando a informação codificadora do molde, a RNAP catalisa o acoplamento da primeira base (frequentemente uma purina) à segunda, um ribonucleosídeo trifosfato direcionado pelo molde para formar um dinucleotídeo (neste exemplo, formando o dinucleotídeo 5′ $pppApN_{OH}$ 3′). (**4**) **Remoção do promotor**: depois que o comprimento da cadeia de RNA atinge ~10 a 20 nt, a polimerase sofre uma mudança conformacional e então se torna capaz de se afastar do promotor, transcrevendo a unidade de transcrição. (**5**) **Alongamento da cadeia**: resíduos sucessivos são adicionados ao terminal 3′-OH da molécula de RNA nascente até que um sinal de terminação de transcrição seja encontrado (**T**). (**6**) **Terminação da cadeia e liberação da RNAP**: após encontrar o sítio de terminação da transcrição, a RNAP passa por uma mudança conformacional adicional que leva à liberação da cadeia de RNA completada, do molde de DNA e da RNAP. A RNAP pode se religar ao DNA começando o processo de busca do promotor e o ciclo é repetido. Observe que todas as etapas do ciclo de transcrição são facilitadas por proteínas adicionais e, de fato, estão frequentemente sujeitas à regulação por fatores atuando como positivos e/ou negativos.

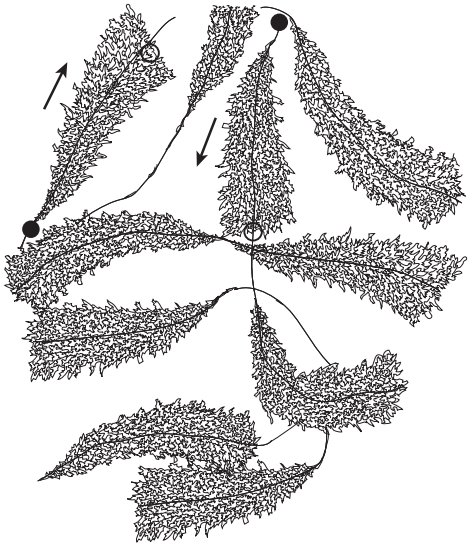


FIGURA 36-4 Representação esquemática de uma eletromicrografia de cópias múltiplas dos genes de um rRNA codificador de um anfíbio no processo da sua transcrição. O aumento é de cerca de 6.000×. Observe que o comprimento dos transcritos aumenta à medida que as moléculas de RNA-polimerase progridem ao longo dos genes de rRNA individuais dos locais de início da transcrição (círculos cheios) para os locais de terminação da transcrição (círculos vazios). A RNA-polimerase I (não visualizada aqui) se encontra na base dos transcritos nascentes de rRNA. Assim, a terminação proximal do gene transcrito apresenta pequenos transcritos presos a ela, enquanto transcritos muito maiores estão presos à terminação distal do gene. As setas indicam a direção da transcrição (5′–3′).

de pelo DNA não promotor, enquanto aumenta simultaneamente a afinidade da holoenzima pelo promotor do DNA. Os múltiplos fatores σ competem pela interação com o núcleo limitante da RNA-polimerase (i.e., E). Cada um desses fatores σ únicos atua como uma proteína reguladora que modifica a **especificidade de reconhecimento do promotor** da holoenzima RNA-polimerase única resultante (i.e., Eσ1,Eσ 2,…). O aparecimento de diferentes fatores σ e sua associação ao núcleo da RNA-polimerase formando novas formas de holoenzimas podem ser correlacionados temporalmente a vários programas de expressão gênica em sistemas procarióticos, tais como a esporulação, o crescimento em várias fontes pobres em nutrientes e a resposta ao choque térmico.

As células de mamíferos possuem três RNA-polimerases distintas dependentes do DNA nuclear

As propriedades das polimerases nucleares de mamíferos são descritas na **Tabela 36-2**. Cada uma dessas RNA-polimerases dependentes de DNA é responsável pela transcrição de conjuntos de genes diferentes. As RNA-polimerases variam em tamanho de 500.000 PM a 600.000 PM. Essas enzimas exibem perfis de subunidades mais complexos que as RNA-polimerases de procariotos. Todas elas possuem duas grandes subunidades e algumas subunidades menores – até 14 no caso da RNA pol III. Entretanto, as subunidades de RNA-polimerases de eucariotos realmente apresentam vastas homologias de sequências de aminoácidos com as RNA-polimerases de procariotos. Recentemente, foi demonstrado que essa homologia se estende ao nível das estruturas tridimensionais. As funções de cada uma das subunidades ainda não são completamente compreendidas.

Uma toxina peptídica do cogumelo *Amanita phalloides*, a α-amanitina, é um inibidor diferencial específico de RNA-poli-

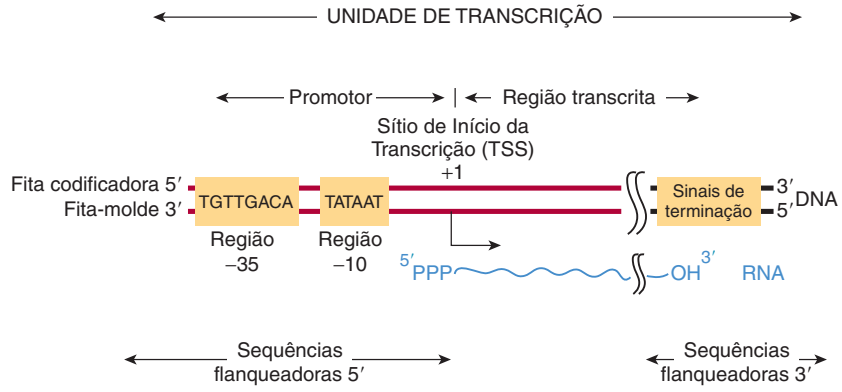


FIGURA 36-5 Promotores bacterianos, tais como aqueles de *E. coli* apresentados aqui, compartilham duas regiões da sequência de nucleotídeos altamente conservada. Estas regiões estão localizadas em 35 e 10 pb molécula acima (na direção 5′ da fita codificadora) do local de início da transcrição (**TSS**), que é indicado por +1. Por convenção, todos os nucleotídeos a montante local de início da transcrição (em +1) são numerados negativamente e são chamados de sequências de flanqueamento 5′, enquanto sequências a jusante dele são numeradas positivamente com o TSS sendo +1. Também por convenção, elementos da sequência regulatória do promotor do DNA, tais como os elementos –35 e TATA *box* são descritos na direção 5′-3′ e como se estivessem na fita codificadora. Entretanto, esses elementos funcionam apenas no DNA de fita dupla. Outros elementos regulatórios transcricionais, no entanto, podem frequentemente atuar em uma direção de modo independente, e tais elementos *cis* são desenhados adequadamente em qualquer esquema (ver também Figura 36-8). Observe que o transcrito produzido a partir dessa unidade de transcrição tem a mesma polaridade ou "sentido" (i.e., orientação 5′-3′) da fita codificadora. Os elementos *cis* das terminações se localizam no final da unidade de transcrição (ver Figura 36-6 para mais detalhes). Por convenção, as sequências a jusante do sítio em que ocorre a terminação da transcrição são chamadas de sequências flanqueadoras 3′.

TABELA 36-2 Nomenclatura e propriedades das RNA-polimerases nucleares dependentes de DNA em mamíferos

Forma da RNA-polimerase	Sensibilidade à α-amanitina	Produtos principais
I	Insensível	rRNA
II	Alta sensibilidade	mRNA, miRNA, snRNA
III	Sensibilidade intermediária	tRNA, RNA, 5S

merases dependentes de DNA do núcleo de eucariotos e, como tal, demonstrou ser uma ferramenta de pesquisa importante (Tabela 36-2). A α-amanitina bloqueia a translocação da RNA-polimerase durante a formação das ligações fosfodiésteres.

A SÍNTESE DE RNA É UM PROCESSO CÍCLICO E ENVOLVE A INICIAÇÃO, O ALONGAMENTO E A TERMINAÇÃO DA CADEIA DE RNA

O processo de síntese de RNA em bactérias – descrito na Figura 36-3 – é cíclico e envolve múltiplas etapas. Primeiro, a holoenzima de RNA-polimerase (E-σ) deve se ligar ao DNA e localizar um promotor (P; Figura 36-3). Uma vez localizado o promotor, o complexo DNA-E-σ-promotor passa por mudança conformacional dependente de temperatura e desenrola ou funde o DNA no sítio de início de transcrição ou em volta dele (em +1). Este complexo é denominado **complexo de pré-iniciação, ou PIC**. Esse desenrolamento permite ao sítio ativo da E-σ acessar a fita-molde que, é claro, determina a sequência de ribonucleotídeos que devem ser polimerizados em RNA. O primeiro nucleotídeo (geralmente, embora nem sempre, uma purina) então se associa ao sítio de ligação do nucleotídeo na subunidade β da enzima, e na presença do próximo nucleotídeo apropriado ligado à polimerase apropriada, a RNAP catalisa a formação da primeira ligação fosfodiéster, e a cadeia nascente é então ligada ao sítio de polimerização na subunidade β da RNAP**.** Essa reação é denominada **iniciação**. A analogia com os sítios A e P no ribossomo deve ser notada; ver a Figura 37–9, adiante. O dinucleotídeo nascente mantém o trifosfato 5′ do nucleotídeo iniciador (Figura 36-3, ATP).

A RNA-polimerase continua a incorporar nucleotídeos, em torno de 3 a 10, até o ponto em que a polimerase sofre outra alteração conformacional e se afasta do promotor; essa reação é denominada de **remoção do promotor** (*clearance* do promotor). Inicia-se, então, a **fase de alongamento**. Neste ponto, a molécula de RNA nascente cresce na direção 5′– 3′ à medida que consecutivas etapas de incorporação de NTP continuam ciclicamente, antiparalelas em relação ao seu molde. A enzima polimeriza os ribonucleotídeos na sequência específica determinada pela fita-molde e interpretada de acordo com as regras de pareamento de bases de Watson e Crick. O pirofosfato é liberado após cada ciclo de polimerização. Como para a síntese do DNA, esse pirofosfato (PP_i) é rapidamente degradado em 2 mols de fosfato inorgânico (P_i) pela pirofosfatase ubíqua, proporcionando, desse modo, a irreversibilidade na reação sintética global. A decisão de permanecer no promotor em um estado equilibrado ou parado, ou da transição para o alongamento, parece ser uma etapa reguladora importante tanto na transcrição procariótica quanto eucariótica da transcrição dos genes do mRNA.

À medida que o complexo de **alongamento** contendo a RNA-polimerase progride ao longo da molécula de DNA, o **desenrolamento do DNA** deve ocorrer de modo a permitir o acesso para o pareamento de bases adequado aos nucleotídeos da fita codificadora. A extensão dessa bolha de transcrição (i.e., desenrolamento do DNA) é constante ao longo da transcrição e foi estimada em cerca de 20 pares de bases por molécula de polimerase. Assim, parece que o tamanho da região de DNA desenrolado é determinado pela polimerase e é independente da sequência de DNA no complexo. A RNA-polimerase possui uma atividade intrínseca de "enzima de desenrolar" que abre a hélice do DNA (i.e., ver formação do PIC anteriormente). O fato de que a dupla-hélice de DNA deve se desenrolar e as fitas se afastarem, pelo menos transitoriamente para a transcrição, significa alguma ruptura da estrutura do nucleossomo nas células eucarióticas. A topoisomerase tanto precede quanto segue a RNA-polimerase para impedir a formação de tensões super-helicoidais que poderiam servir para aumentar a energia necessária para desenrolar o molde de DNA antes da RNAP.

A **terminação** da síntese da molécula de RNA em bactérias é sinalizada por uma sequência na fita-molde da molécula de DNA – um sinal que é reconhecido pela proteína de terminação, **o fator rho (ρ)**. O fator rho é uma helicase estimulada por RNA dependente de ATP que rompe o complexo de alongamento de transcrição ternária composto por RNA-polimerase e RNA e DNA nascentes. Em alguns casos, a RNAP bacteriana pode reconhecer diretamente os sinais de terminação codificados no DNA (Figura 36-3; T) sem o auxílio do fator rho. Após o término da síntese de RNA, a enzima se separa do molde de DNA e, provavelmente, se dissocia pra liberar a enzima do núcleo e liberar o fator. Com o auxílio de outro fator σ, a enzima do núcleo reconhece, então, um promotor, no qual a síntese de uma nova molécula de RNA se inicia. Em células eucarióticas, o término é bem menos compreendido, mas as enzimas catalisadoras do processamento de RNA, do término e as proteínas de poliadenilação, parecem se acumular na direção da RNA-polimerase II logo após a iniciação (ver a seguir). Mais de uma molécula de RNA-polimerase pode transcrever a mesma fita-molde de um gene simultaneamente, mas o processo é faseado e espaçado, de tal modo que a qualquer momento, cada uma está transcrevendo uma porção diferente da sequência de DNA (Figuras 36-1 e 36-4).

A FIDELIDADE E A FREQUÊNCIA DA TRANSCRIÇÃO SÃO CONTROLADAS POR PROTEÍNAS LIGADAS A DETERMINADAS SEQUÊNCIAS DE DNA

A análise da sequência de DNA de genes específicos permitiu o reconhecimento de algumas sequências importantes na transcrição de genes. A partir do grande número de genes bacterianos estudados, é possível construir modelos de consenso de sinais de transcrição de iniciação e terminação.

A questão "Como a RNAP encontra o local correto para iniciar a transcrição?" não é trivial quando a complexidade do geno-

ma é levada em conta. A *E.coli* possui 4×10^3 sítios de iniciação de transcrição (i.e., promotores de genes) em $4{,}2 \times 10^6$ pares de bases (pb) de DNA. A situação é ainda mais complexa em humanos, em que até 10^5 sítios de iniciação de transcrição estão distribuídos ao longo de 3×10^9 pb de DNA. A RNAP pode se ligar, com baixa afinidade, a várias regiões do DNA, mas ela verifica a sequência do DNA – em uma taxa $\geq 10^3$ pb/s – até reconhecer certas regiões específicas do DNA, às quais ela se liga com maior afinidade. Essas regiões são denominadas promotoras, e é a associação da RNAP com os promotores que garante o início preciso da transcrição. O processo de reconhecimento e utilização do promotor é o alvo para a regulação tanto em bactérias quanto em humanos.

Os promotores bacterianos são relativamente simples

Os promotores bacterianos têm aproximadamente 40 nucleotídeos (40 pb ou quatro voltas de DNA de dupla-hélice) de comprimento, uma região pequena o bastante para ser coberta por uma molécula de RNA-holopolimerase de *E.coli*. Em um promotor de consenso há dois elementos de sequência curtos conservados. Aproximadamente 35 pb a montante do local de início da transcrição se encontra uma sequência consenso de oito pares de nucleotídeos (consenso: 5′-TGTTGACA-3′) às quais a RNAP se liga para formar o chamado **complexo fechado**. Mais próximo do local de início da transcrição – cerca de 10 nucleotídeos a montante – se encontra uma sequência de seis pares de nucleotídeos rica em A+T (consenso: 5′-TATAAT-3′). Juntos, esses elementos de sequência conservados incluem o promotor e são mostrados esquematicamente na Figura 36-5. A última sequência tem uma baixa temperatura de fusão porque não possui os pares de nucleotídeos CG. Assim, acredita-se que a chamada **TATA *box*** ("caixa" TATA) facilite a dissociação das duas fitas de DNA, de modo que a RNA-polimerase ligada à região do promotor possa ter acesso à sequência de nucleotídeos de sua fita-molde imediatamente a jusante. Uma vez que esse processo ocorra, a combinação da RNA-polimerase mais o promotor é chamada de **complexo aberto**. Outras bactérias possuem sequências de consenso um pouco diferentes em seus promotores, mas todas, em geral, têm dois componentes para o promotor; elas tendem a estar na mesma posição em relação ao local de início da transcrição e, em todos os casos, as sequências entre os dois elementos promotores não têm nenhuma semelhança, mas ainda **fornecem funções de espaçamento críticas** que facilitam o reconhecimento de sequências −35 e −10 pela holoenzima de RNA-polimerase. No interior da célula bacteriana, diferentes conjuntos de genes são muitas vezes regulados coordenadamente. Um modo importante de se conseguir isso é o fato desses genes corregulados partilharem sequências promotoras específicas −35 e −10. Esses promotores únicos são reconhecidos por diferentes fatores σ ligados ao núcleo da RNA-polimerase (i.e., $E\sigma_1$, $E\sigma_2$,…).

Os **sinais de terminação** de transcrição rho dependentes em *E. coli* também parecem ter uma sequência de consenso distinta, como mostrado na **Figura 36-6**. A sequência de consenso conservada, que tem cerca de 40 pares de nucleotídeos de comprimento, pode ser vista contendo uma repetição invertida interrompida ou hifenizada, seguida de uma série de pares de bases AT. À medida que a transcrição prossegue por meio da repetição invertida hifenizada, o transcrito gerado pode formar a estrutura intramolecular *hairpin* (grampo de cabelo), também apresentada na Figura 36-6.

A transcrição segue para a região AT, e com o auxílio da proteína de terminação ρ, a RNA-polimerase para, se dissocia do molde de DNA e libera o transcrito nascente.

Como discutido em detalhe no Capítulo 38, a transcrição do gene bacteriano é controlada pela ação de proteínas repressoras e ativadoras. Essas proteínas geralmente se ligam a sequências de DNA únicas e específicas que ficam adjacentes aos promotores. Essas proteínas repressoras e ativadoras afetam a capacidade da RNA-polimerase de se ligar ao promotor do DNA e/ou formar complexos abertos. O efeito resultante é o estímulo ou a inibição da formação do PIC e o início da transcrição – consequentemente bloqueando ou estimulando a síntese de RNA específico.

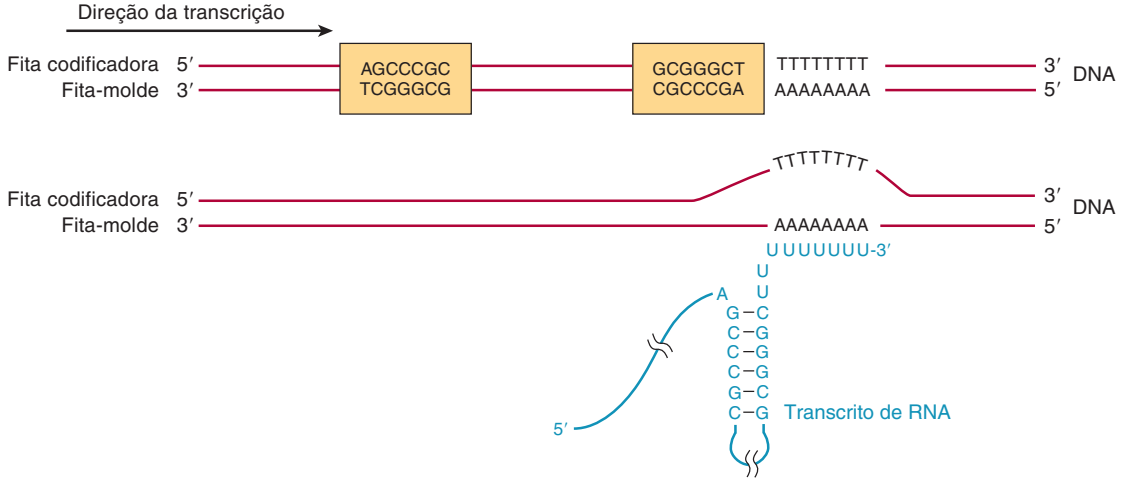


FIGURA 36-6 O sinal de terminação predominante da transcrição bacteriana contém uma repetição hifenizada repetida (as duas áreas em caixas) seguida de um trecho de pares de bases AT (acima). A repetição invertida, quando transcrita em RNA, pode gerar a estrutura secundária no transcrito de RNA (**abaixo**). A formação desse grampo de RNA faz a RNA-polimerase sofrer uma pausa e subsequentemente o fator de terminação ρ (rho) interage com a polimerase pausada e induz a terminação da cadeia por meio de mecanismos ainda não completamente elucidados.

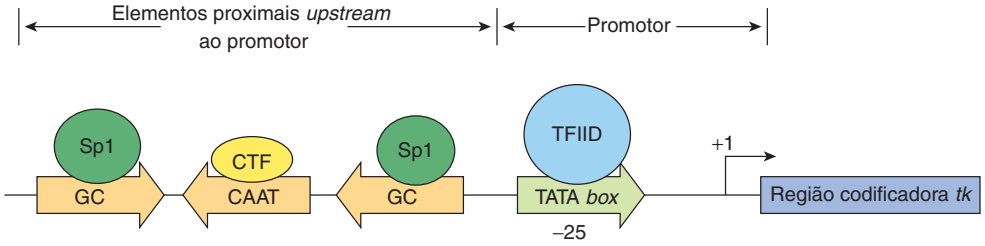


FIGURA 36-7 Elementos de transcrição e fatores de ligação no gene da timidinacinase (*tk*) no vírus da herpes simplex. A RNA-polimerase II dependente de DNA (não mostrada) se liga à região que contém a TATA *box* (que está ligada pelo fator de transcrição TFIID) e TSS em +1 (ver também Figura 36-9) para formar um complexo pré-iniciação multicomponente capaz de iniciar a transcrição em um único nucleotídeo (+1). A frequência desse evento é aumentada pela presença de elementos molécula a montante atuando como *cis* (as GC e CAAT *boxes*) localizados ou próximos do promotor (promotor proximais) ou distantes do promotor (elementos distais; Figura 36-8). Os elementos *cis* dos DNAs proximal e distal estão ligados por fatores de transcrição atuando como *trans*, neste exemplo, Sp1 e CTF (também chamados C/EBP, NF1, NFY). Esses elementos *cis* podem funcionar independentemente da orientação (**setas**).

Os promotores dos eucariotos são mais complexos

É evidente que os sinais no DNA que controlam a transcrição nas células de eucariotos são de vários tipos. Dois tipos de elementos de sequência são promotores proximais. Um desses tipos define **onde a transcrição deve começar** ao longo do DNA, e o outro contribui para os mecanismos que controlam **com que frequência** esse evento deve ocorrer. Por exemplo, no gene da timidinaquinase do vírus herpes simplex, que utiliza fatores de transcrição do seu hospedeiro mamífero para o seu programa inicial de expressão de gene, há um único local específico de início da transcrição, e a transcrição precisa a partir desse local de início depende de uma sequência de nucleotídeos localizada 32 nucleotídeos a montante desse ponto (i.e., em –32) (**Figura 36-7**). Essa região tem a sequência de **TATAAAAG** e apresenta uma semelhança notável com a funcionalmente relacionada **TATA *box***, que está localizada cerca de 10 pb a montante do local de início do mRNA de procariotos (Figura 36-5). A mutação ou inativação da TATA *box* reduz acentuadamente a transcrição desse e de muitos outros genes que contêm esse elemento de consenso ***cis*-ativo** (ver **Figuras 36-7** e **36-8**). A TATA *box* geralmente está localizada 25 a 30 pb a montante do local de início da transcrição em genes de mamíferos que a contêm. A sequência de consenso para a TATA *box* é TATAAA, embora numerosas variações tenham sido descritas. A TATA *box* humana está ligada por uma **proteína de ligação de TATA** (**TBP**) de 34 kDa, que é uma subunidade em pelo menos dois complexos de múltiplas subunidades, TFIID e SAGA/PCAF.

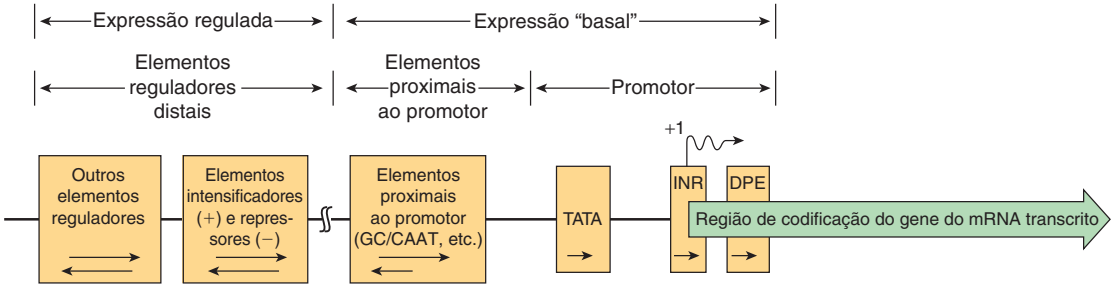


FIGURA 36-8 Diagrama esquemático mostrando as regiões controladoras da transcrição em gene eucariótico hipotético produtor de mRNA transcrito pela RNA-polimerase II. Tal gene pode ser dividido em suas regiões codificadora e reguladora, como definido pelo sítio de início da transcrição (**seta**; +1). A região codificadora contém a sequência de DNA que é transcrita em mRNA, que é, em última análise, traduzida em proteína. A região reguladora consiste em duas classes de elementos. Uma classe é responsável por garantir a expressão basal. O "promotor" é frequentemente composto pela TATA *box* e/ou Inr e/ou elementos DPE e dirige a RNA-polimerase II para o local correto (fidelidade). Entretanto, em certos genes que não possuem TATA, os chamados promotores sem TATA, um iniciador (Inr) e/ou elementos DPE podem direcionar a polimerase para esse local. Outro componente, os elementos a montante, especificam a frequência da iniciação; tais elementos podem ser ou proximais (50 a 200 pb) ou distais (1.000 a 10^6 pb) em relação ao promotor, como mostrado. Entre os elementos proximais melhor estudados está a CAAT *box*, mas vários outros elementos (ligados pelas proteínas transativadoras Sp1, NF1, AP1, etc.) podem ser usados em vários genes. Os elementos distais estimulam ou reprimem a expressão, e vários destes medeiam a resposta a vários sinais, incluindo hormônios, choque de calor, metais pesados e substâncias químicas. A expressão tecidual específica também envolve sequências específicas desse tipo. A dependência de orientação de todos os elementos é indicada pelas setas no interior das caixas. Por exemplo, elementos proximais ao promotor (TATA *box*, INR, DPE) devem estar em uma orientação 5′-3′, enquanto os elementos a montante proximais frequentemente trabalham melhor na orientação 5′-3′, mas alguns podem ser revertidos. As localizações de alguns elementos não são fixas em relação ao sítio de início da transcrição. De fato, alguns elementos responsáveis pela expressão regulada podem ser localizados intercalados com os elementos a montante ou podem estar localizados a jusante da molécula a partir do sítio de iniciação.

As subunidades não TBP de TFIID são proteínas chamadas de **fatores associados de TBP (TAF).** Esse complexo de TBP e TAF é chamado de TFIID. A ligação do complexo TFIID TBP-TAF à sequência da TATA *box* representa a primeira etapa na formação do complexo de transcrição no promotor.

Alguns genes codificadores do mRNA de eucariotos não possuem um consenso de TATA *box*. Em tais casos, elementos *cis* adicionais, uma **sequência iniciadora (Inr**) e/ou o **elemento promotor a jusante (DPE**), direcionam a maquinaria da transcrição da RNA-polimerase II para o promotor e, assim o fazendo, proporcionam o início da transcrição basal a partir do local correto. O elemento Inr expande o local de início (de –3 a +5) e consiste em uma sequência geral de consenso TCA_{+1} G/T T T/C (A_{+1} indica o primeiro nucleotídeo transcrito). As proteínas que se ligam ao Inr para direcionar a ligação da pol II incluem o TFIID. Os promotores que possuem tanto uma TATA *box* quanto o Inr podem ser transcritos com mais força e mais vigorosamente que os promotores com apenas um desses elementos. O DPE possui a sequência de consenso A/GGA/T CGTG e está localizado cerca de 25 pb a jusante do local de início +1. Como o Inr, as sequências de DPE também estão ligadas por subunidades TAF de TFIID. Em uma pesquisa com milhares de genes codificadores de proteínas de eucariotos, cerca de 30% continham TATA *box* e Inr, 25% continham Inr e DPE, 15% continham todos os três elementos, enquanto cerca de 30% continham somente o Inr.

As sequências, geralmente, mas nem sempre, determinam com que frequência um evento de transcrição ocorre logo a montante do local de início. Mutações nessas regiões reduzem a frequência de inícios de transcrição de 10 a 20 vezes. Típicos desses elementos de DNA são as GC e CAAT *boxes*, assim chamadas devido às sequências de DNA envolvidas. Como ilustrado na Figura 36-7, cada uma dessas *boxes* se liga a uma proteína específica, Sp1 no caso da GC *box* e CTF para a CAAT *box*; ambas se ligam por meio de seus **domínios ligadores de DNA** (**DBD**) distintos. A frequência do início da transcrição é uma consequência dessas interações proteína-DNA e de interações complexas entre os domínios particulares dos fatores de transcrição (diferentes dos domínios DBD – assim chamados de **domínios de ativação**; **AD**) dessas proteínas e do restante da maquinaria de transcrição (RNA-polimerase II, os **fatores basais ou gerais GTFs**, **TFIIA**, **B**, **D**, **E**, **F**, **H** e outros fatores correguladores tais como o Mediador, fatores remodeladores de cromatina e modificadores de cromatina) (ver a seguir e nas Figuras 36-9 e 36-10). A interação proteína-DNA na TATA *box* envolve a RNA-polimerase II e outros componentes da maquinaria de transcrição basal garantem a fidelidade do início.

Juntos, o promotor e os elementos *cis*-ativos proximais ao promotor, localizados a montante da molécula, conferem a um gene fidelidade e frequência de iniciação. A TATA *box* tem uma exigência particularmente rígida tanto para a posição quanto para a orientação. Como com os promotores bacterianos, alterações de uma única base em qualquer um desses elementos *cis* podem ter efeitos dramáticos no funcionamento pela redução da afinidade de ligação dos fatores *trans* cognatos (TFIID/TBP ou Sp1, CTF, e fatores semelhantes). Os espaçamentos da TATA *box*, Inr e DPE também são críticos.

Uma terceira classe de elementos de sequência pode tanto aumentar quanto diminuir a taxa de início de transcrição de genes de eucariotos. Esses elementos são chamados de **intensificadores** ou **repressores** (**ou silenciadores**) dependendo de como eles afetam a síntese do RNA. Eles foram encontrados em diversas localizações tanto a montante quanto a jusante do local de início da transcrição e até no interior de proteínas transcritas de porções codificadoras de alguns genes. Intensificadores e silenciadores podem exercer os seus efeitos quando localizados a milhares ou mesmo dezenas de milhares de bases de distância a partir das unidades de transcrição localizadas no mesmo cromossomo. Surpreendentemente, os intensificadores e os silenciadores podem funcionar de modo independente da orientação. Literalmente, centenas desses elementos foram descritos. Em alguns casos, os requisitos da sequência para a ligação são rigidamente restritos; em outros, considerável variação na sequência é permitida. Algumas sequências se ligam apenas a uma proteína, mas a maioria se liga a várias proteínas diferentes. Juntos, esses muitos transfatores se ligando aos elementos *cis* distais e proximais aos promotores regulam a transcrição em resposta a um vasto conjunto de sinais biológicos. Tais eventos reguladores transcricionais contribuem de modo importante para o controle da expressão gênica.

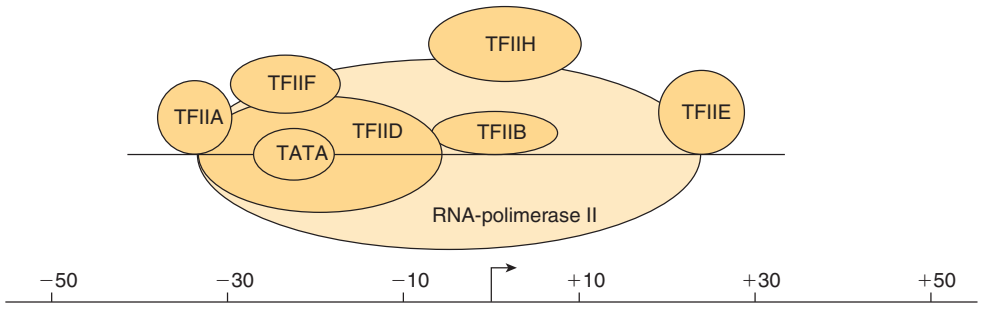


FIGURA 36-9 O complexo de transcrição basal eucariótico. A formação do complexo de transcrição basal começa quando o TFIID se liga à TATA *box*. Ele dirige a reunião de vários outros componentes por meio de interações proteína-DNA e proteína-proteína; TFIIA, B, E, F, H e polimerase II (pol II). O complexo inteiro expande o DNA da posição –30 a +30 em relação ao sítio de início da transcrição (TSS; + 1, marcado por uma seta dobrada). No nível atômico, as estruturas derivadas do raio X da RNA-polimerase II sozinha e da TFIID ligada ao promotor de DNA TATA na presença ou de TFIIB ou de TFIIA foram todas elucidadas a uma resolução de 3 Å. As estruturas dos complexos TFIID e TFIIH foram determinadas por microscopia eletrônica a uma resolução de 30 Å. Assim, as estruturas moleculares da maquinaria de transcrição estão começando a ser elucidadas. A maior parte dessa informação estrutural é consistente com os modelos apresentados aqui.

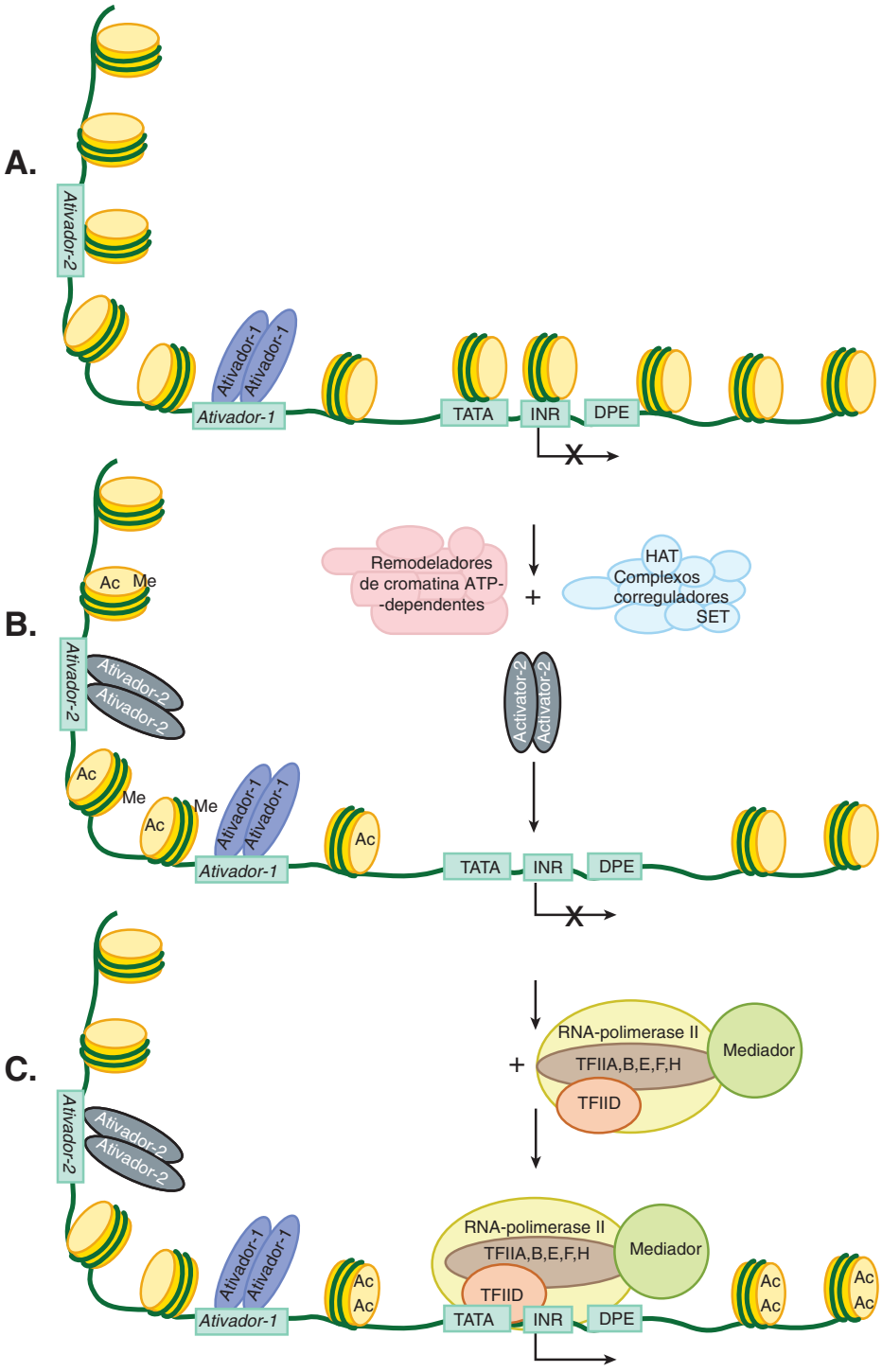


FIGURA 36-10 A expulsão do nucleossomo por correguladores ativos de cromatina facilita a formação e transcrição do PIC. Um gene inativo codificador de mRNA (ver X sobre TSS), mostrado em **A**, com um único fator de transcrição dimérico (Ativador 1; ovais violeta) ligado ao seu sítio de ligação intensificador cognato (*Ativador-1*). Este elemento intensificador particular era livre de nucleossomos e, portanto, disponível para interação com sua proteína de ligação ativadora cognata. Entretanto, esse gene ainda está inativo (X sobre TSS) devido ao fato de que uma parte do seu intensificador (nessa ilustração, o intensificador é bipartido e composto pelos sítios de ligação do DNA *Ativador-1* e *Ativador-2*) *e* a totalidade de promotores é coberta por nucleossomos. (**B**) O intensificador Ativador-1 ligado ao DNA interage com qualquer um de uma série de remodeladores de cromatina ATP-dependentes distintos e com complexos correguladores modificadores de cromatina. Esses correguladores juntos têm a capacidade tanto de mover e/ou remover nucleossomos (remodeladores ATP-dependentes) quanto de modificar covalentemente as histonas nucleossomais usando acetilases intrínsecas (HAT; resultando em acetilação [Ac]) e metilases (SET; resultando em metilação [Me], entre outros PTM; Tabela 35-1), levados a cabo por subunidades desses complexos. (**C**) As mudanças resultantes na posição do nucleossomo e na sua ocupação permitem a ligação do segundo dímero Ativador-2 às sequências de DNA do *Ativador-2*, que leva à ligação da maquinaria de transcrição (TFIIA, B, D, E, F, H; Polimerase II e Mediador) ao promotor (TATA INR-DPE) e à formação de um PIC ativo, que leva à transcrição ativada.

Sinais específicos regulam a terminação da transcrição

Os **sinais para a terminação da transcrição** pela RNA-polimerase II eucariótica são pouco compreendidos. Parece que os sinais de terminação existem bem mais a jusante da sequência codificadora dos genes de eucariotos. Por exemplo, o sinal de terminação da transcrição para a β-globina de ratos ocorre em várias posições de 1.000 a 2.000 bases além do sítio em que a cauda poli (A) do mRNA será eventualmente adicionada. Sabe-se menos ainda sobre o processo de terminação ou se fatores de terminação específicos semelhantes ao fator ρ bacteriano estão envolvidos. Entretanto, sabe-se que a formação do terminal 3′ do mRNA, que é produzido pós-transcricionalmente, é, de algum modo, acoplada a eventos ou estruturas formadas no momento e local da iniciação. Além disso, a formação do mRNA e, nesse caso, a formação da terminação 3′ do mRNA, depende de uma estrutura especial presente na terminação C da maior subunidade de RNA-polimerase II, o **domínio C-terminal** ou **CTD** (ver a seguir), e esse processo parece envolver pelo menos duas etapas da seguinte maneira. Após a RNA-polimerase II ter percorrido a região da unidade de transcrição codificadora da extremidade 3′ do transcrito, as endonucleases de RNA clivam o transcrito primário em uma posição cerca de 15 bases na direção 3′ da sequência de consenso **AAUAAA**, que serve nos transcritos de eucariotos como um sinal de clivagem e poliadenilação. Finalmente, esse recém-formado terminal 3′ é poliadenilado no nucleoplasma, como descrito adiante.

O COMPLEXO DE TRANSCRIÇÃO EM EUCARIOTOS

Um aparato complexo composto por até 50 proteínas exclusivas proporciona uma transcrição precisa e regulável de genes de eucariotos. As enzimas RNA-polimerases (pol I, pol II e pol III) transcrevem a informação contida na fita-molde do DNA em RNA. Essas polimerases devem reconhecer um local específico no promotor para iniciar a transcrição no nucleotídeo certo. Ao contrário da situação em procariotos, contudo, as RNA-polimerases de eucariotos, *in vitro*, não são capazes de sozinhas discriminar entre as sequências promotoras e outras regiões não promotoras do DNA. Todas as formas de RNA-polimerases de eucariotos necessitam de outras proteínas, chamadas de fatores de transcrição gerais ou GTF. A RNA-polimerase II necessita de TFIIA, B, D (ou TBP), E, F e H tanto para facilitar a ligação ao promotor específico da enzima quanto para a formação do complexo de pré-iniciação (PIC). As RNA-polimerases I e III precisam de suas próprias polimerases e GTF específicos. Além disso, as RNA-polimerases II e os GTF não respondem às proteínas ativadoras e podem apenas catalisar a transcrição basal ou não regulada *in vitro*. Outro grupo de proteínas – os **coativadores ou correguladores** – trabalham em conjunto com as proteínas transativadoras ligadoras de DNA para se comunicar com Pol II/GTF para regular a taxa de transcrição (ver a seguir).

Formação do complexo de transcrição pol II

Em bactérias, o complexo holoenzima – polimerase – fator σ, Eσ, se liga seletivamente ao promotor do DNA para formar o PIC. A situação é muito mais complexa em genes de eucariotos. Os genes codificadores de mRNA, que são transcritos pela pol II, são descritos como um exemplo. No caso dos genes transcritos pela pol II, a função dos fatores σ é assumida por várias proteínas. A formação do PIC necessita de pol II e dos seis GTF (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH). Esses GTF servem para promover a transcrição da RNA-polimerase II essencialmente em todos os genes. Alguns desses GTF são compostos de múltiplas subunidades. **O TFIID, que se liga ao elemento promotor da TATA *box* por meio de sua subunidade TBP**, é o único desses fatores que é independentemente capaz de se ligar especificamente e com alta afinidade ao promotor de DNA. O TFIID consiste em 15 subunidades, TBP e 14 Fatores Associados ao TBP, ou TAF.

O TBP se liga à TATA *box* na cavidade menor do DNA (a maioria dos fatores de transcrição se liga à cavidade maior) e provoca uma curvatura ou dobra de aproximadamente 100 graus na hélice do DNA. Essa curvatura facilita a interação dos TAF com outros componentes do complexo de iniciação da transcrição, com os promotores multicomponentes de eucariotos e, possivelmente, com os fatores ligados a elementos a montante. Embora inicialmente definido como um componente somente necessário para a transcrição de promotores de genes pol II, o TBP, em virtude de sua associação com conjuntos distintos de TAFs polimerase específicos, é também um componente importante dos complexos de iniciação da transcrição de pol I e pol II, mesmo que eles não contenham as TATA *boxes*.

A ligação do TFIID marca um promotor específico para a transcrição. Das várias etapas subsequentes *in vitro*, a primeira é a ligação do TFIIA e, depois, o TFIIB se liga ao complexo promotor – TFIID. Isto resulta em um complexo ternário estável, que então é localizado mais precisamente e, ligado mais fortemente ao sítio de início da transcrição. Esse complexo então atrai e amarra o complexo pol II – TFIIF ao promotor. A adição de TFIIE e do TFIIH são as etapas finais na formação do PIC. O TFIIE parece se ligar ao complexo com pol II-TFIIF, e o TFIIH é, então, recrutado. Cada um desses eventos de ligação aumenta o tamanho do complexo, de modo que finalmente cerca de 60 pb (de −30 a +30 em relação a +1, o nucleotídeo onde se inicia a transcrição) são percorridos (Figura 36-9). O PIC está agora completo e é capaz da transcrição basal iniciada a partir do nucleotídeo correto. Em genes sem TATA *box*, os mesmos fatores são necessários. Nesses casos, o Inr ou o DPE servem para (ver Figura 36-8) posicionar o complexo para a iniciação da transcrição precisa.

A acessibilidade ao promotor e, portanto, a formação do PIC é frequentemente modulada por nucleossomos

Em certos genes de eucariotos, a maquinaria de transcrição (pol II, etc.) não pode acessar as sequências promotoras (i.e., TATA–INR–DPE) porque esses elementos promotores essenciais estão enrolados nos nucleossomos (Figuras 35-2, 35-3 e 36-10). Somente após a ligação dos fatores de transcrição ao intensificador do DNA a montante do promotor na molécula e após o recrutamento da cromatina, remodelando e modificando os fatores correguladores tais como Swi/Snf, SRC-1, p300/CBP (ver Capítulo 42), ou fatores P/CAF, é que os nucleossomos repressores são removidos (Figura 36-10). Uma vez que o promotor é "aberto" após a expulsão do nu-

cleossomo, os GTF e a RNA-polimerase II podem se ligar e iniciar a transcrição do gene de mRNA. Observe que a ligação de transativadores e correguladores pode ser sensível a e/ou controlar diretamente o estado de modificação covalente das histonas no interior dos nucleossomos e em volta do promotor e do intensificador e, assim, aumentar ou diminuir a capacidade de todos os outros componentes necessários para que a formação do PIC interaja com um gene particular. O chamado **código epigenético das modificações de histonas e proteínas** pode contribuir de forma importante para o controle da transcrição genética. De fato, as mutações em proteínas que catalisam (escritoras do código), removem (limpadoras do código) ou que ligam diferencialmente (leitoras do código) histonas modificadas, podem levar a doenças em humanos.

A fosforilação ativa a pol II

A pol II de eucariotos é composta de 12 subunidades. As duas subunidades maiores (PM de 150 e 190 kDa) são homólogas às subunidades β and β′ de bactérias. Além do maior número de subunidades, a pol II de eucariotos difere de sua equivalente em procariotos por apresentar uma série de repetições heptais com a sequência de consenso Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser no terminal carboxila da maior subunidade de pol II. Esse **domínio de repetição do terminal carboxila (CTD)** possui 26 unidades repetidas na levedura de cerveja e 52 unidades nas células de mamíferos. O CTD é um substrato para várias enzimas (quinases, fosfatases, prolilisomerases, glicosilases). A fosforilação do CTD foi descoberta primeiramente como CTD PTM. O componente quinase de TFIIH pode modificar o CTD. O CTD modificado covalentemente é o sítio de ligação para um grande conjunto de proteínas e interage com muitas enzimas modificadoras e processadoras de mRNA e proteínas de transporte nuclear. A associação desses fatores com o CTD da RNA-polimerase II (e outros componentes da maquinaria basal) serve, portanto, para acoplar o início da transcrição com o *splicing* do mRNA facilitado pelo capuz (*capping*), para a formação da extremidade 3′ e o transporte da enzima para o citoplasma (ver a seguir). A polimerização da pol II é ativada quando fosforilada nos resíduos Ser e Thr e exibe atividade reduzida quando o CTD é desfosforilado. A fosforilação/desfosforilação do CTD é crítica para a remoção do promotor, o alongamento e a terminação, ainda, para o processamento adequado do mRNA. A pol II que não possui a cauda de CTD é incapaz de ativar a transcrição, e as células que expressam pol II sem o CTD são inviáveis. Esses resultados ressaltam a importância desse domínio.

A pol II pode estar associada a outras proteínas denominadas **Mediadoras** ou proteínas **Med** para formar um complexo, algumas vezes chamado de holoenzima de pol II; este complexo pode se formar no promotor ou em solução antes da formação do PIC (ver a seguir). As proteínas Med são essenciais para a regulação adequada da transcrição de pol II, servindo para várias funções, tanto ativando quanto reprimindo a transcrição. Assim, a Mediadora, como o TFIID, é um corregulador transcricional (**Figura 36-11**). As formas complexas da holoenzima de RNA-

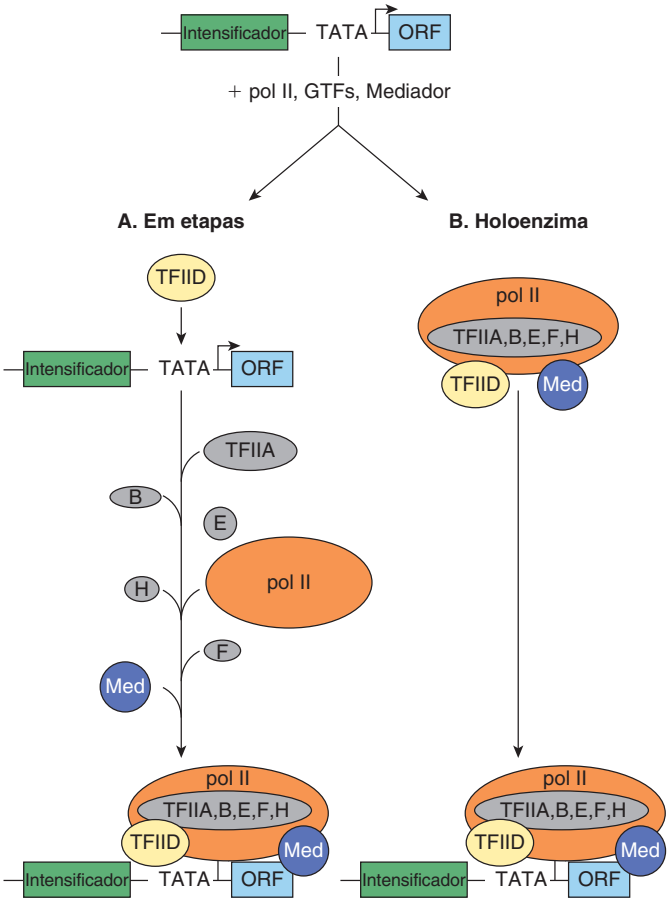


FIGURA 36-11 Modelos para a formação de um complexo pré-iniciação de RNA-polimerase II. Mostrada acima, se encontra uma típica unidade de transcrição codificadora de mRNA: intensificador-promotor (TATA) – sítio de iniciação (seta dobrada) e região transcrita (ORF; quadro de leitura aberto). Os PICs se formam por pelo menos dois mecanismos distintos: (**A**) a ligação em etapas dos GTF, pol II e Mediador ou (**B**) pela ligação de um único complexo multiproteína composto de pol II, Med e seis GTF. As proteínas transativadoras ligadas ao DNA ligam especificamente intensificadores, e, em parte, facilitam a formação do PIC (ou seu funcionamento) pela ligação direta às subunidades TFIID-TAF ou subunidades Med do Mediador (não mostrado, ver Figura 36-10); o(s) mecanismo(s) molecular(es) pelos quais tais interações proteína-proteína estimulam a transcrição permanecem um assunto de investigação intensa.

-polimerase II (pol II mais Med) foram descritas em células humanas que contêm mais de 30 proteínas Med (Med1 a Med31).

O papel dos ativadores e correguladores da transcrição

O TFIID foi originalmente considerado como uma proteína única, a TBP. Entretanto, diversas evidências levaram à importante descoberta de que o TFIID é, na verdade, um complexo composto de TBP e de 14 TAF. A primeira evidência de que o TFIID era mais complexo do que apenas moléculas de TBP veio da observação de que o TBP se liga a um segmento de 10 pb de DNA, imediatamente sobre a TATA *box* do gene, enquanto holo-TFIID nativos cobrem uma região de 35 pb ou maior (Figura 36-9). Em segundo lugar, o TBP tem massa molecular de 20 a 40 kDa (dependendo da espécie), enquanto o complexo TFIID tem massa de cerca de 1.000 kDa. Finalmente, e talvez mais importante, o TBP apoia a transcrição basal, mas não a transcrição aumentada gerada por certos ativadores, por exemplo, o Sp1 ligado à GC *box*. O TFIID, por outro lado, apoia tanto a transcrição basal quanto a transcrição intensificada por Sp1, Oct1, AP1, CTF, ATF, etc. **(Tabela 36-3)**. Os TAF são essenciais para essa transcrição intensificada por ativador. Há, provavelmente, várias formas de TFIID que diferem ligeiramente em seus complementos de TAF. Assim, diferentes combinações de TAF com TBP – ou um dos vários recentemente descobertos fatores semelhantes a TBP (TLF) – se ligam a diferentes promotores, e relatos recentes sugerem que isto pode ser responsável pela ativação gênica seletiva em células ou tecidos, observada em vários promotores e para diferentes intensidades de certos promotores. Os TAF, uma vez necessários para a ação de ativadores, são frequentemente chamados de coativadores ou correguladores. Assim, há três classes de fatores de transcrição envolvidos na regulação dos genes da pol II: pol II e GTF, correguladores e ativadores/repressores ligadores de DNA **(Tabela 36-4)**. Como essas classes de proteínas interagem para controlar tanto o local quanto a frequência da transcrição é uma questão de importância central e investigação ativa. Atualmente, pensa-se que os correguladores atuam tanto como uma ponte entre os transativadores ligadores de DNA e poli II/GTFs quanto modificam a cromatina.

TABELA 36-3 Alguns dos elementos controladores da transcrição da RNA-polimerase II de mamíferos, suas sequências de consenso e os fatores que se ligam a eles

Elemento	Sequência de consenso	Fator
TATA *box*	TATAAA	TBP/TFIID
CAAT *box*	CCAATC	C/EBP*, NF-Y*
GC *box*	GGGCGG	Sp1*
	CAACTGAC	Myo D
	T/CGGA/CN_5GCCAA	NF1*
Octâmero Ig	ATGCAAAT	Oct1, 2, 4, 6*
AP1	TGAG/CTC/AA	Jun, Fos, ATF*
Resposta sérica	GATGCCCATA	SRF
Choque térmico	$(NGAAN)_3$	HSF

Nota: uma lista completa incluiria centenas de exemplos. Os asteriscos significam que existem vários membros dessa família.

TABELA 36-4 Três classes de fatores de transcrição envolvidos na transcrição do gene de mRNA

Mecanismos gerais	Componentes específicos
Componentes basais	RNA-polimerase II, TBP, TFIIA, B, D, E, F e H
Correguladores	TAF (TBP + TAF) = TFIID; certos genes Mediador, Meds Modificadores de cromatina Remodeladores de cromatina
Ativadores	SP1, ATF, CTF, AP1, etc.

Dois modelos podem explicar a formação do complexo de pré-iniciação

A formação do PIC descrita anteriormente é baseada na adição sequencial de componentes purificados, como observado por meio de experimentos *in vitro*. Uma característica essencial desse modelo é que a formação do PIC ocorre em um molde de DNA em que todas as proteínas de transcrição têm livre acesso ao DNA. Por conseguinte, os ativadores de transcrição que possuem ligações de DNA autônomas e domínios de ativação (ver Capítulo 38) funcionam estimulando a formação do PIC. Aqui, os complexos TAF ou mediadores são considerados como fatores de ponte que fazem a comunicação entre os ativadores ligados a montante da molécula e os GTF e pol II. Essa imagem assume que há uma **formação em etapas** do PIC – promovido por várias interações entre os ativadores, coativadores, e componentes do PIC, como ilustrado no painel A da Figura 36-11. Esse modelo é apoiado por observações de que muitas dessas proteínas podem, na verdade, se ligar umas às outras *in vitro*.

Evidências recentes sugerem que existe outro mecanismo possível de formação do PIC e, portanto, da regulação da transcrição. Primeiro, os grandes complexos pré-montados de GTF e pol II são encontrados em extratos celulares, e esses complexos podem se associar ao promotor em uma única etapa. Em segundo lugar, a taxa de transcrição obtida quando ativadores são adicionados a concentrações limitantes da holoenzima de pol II pode ser alcançada aumentando a concentração da holoenzima de pol II na ausência dos ativadores. Assim, pelo menos *in vitro*, pode-se estabelecer condições nas quais os ativadores não são, em si mesmos, absolutamente essenciais para a formação do PIC. Essas observações levaram à **hipótese do "recrutamento"**, que já foi testada experimentalmente. Simplificando, o papel dos ativadores e de alguns coativadores pode ser o de apenas recrutar um complexo pré-formado de holoenzima-GTF para o promotor. A exigência para um domínio de ativação é contornada quando um componente de TFIID ou da holoenzima pol II são artificialmente amarrados, utilizando técnicas de DNA recombinante, ao DBD de um ativador. Essa ancoragem, por meio do componente DBD da molécula ativadora, leva a uma estrutura de transcrição competente, e não há qualquer requisito adicional para o domínio de ativação do ativador. Nesse sentido, o papel dos domínios de ativação é o de direcionar os complexos pré-formados de holoenzima–GTF para o promotor; eles não auxi-

liam na formação do PIC (ver painel B, Figura 36-11). Nesse modelo, a eficácia do processo de recrutamento determina diretamente a taxa de transcrição de um determinado promotor.

AS MOLÉCULAS DE RNA SÃO PROCESSADAS ANTES DE SE TORNAREM FUNCIONAIS

Em organismos procarióticos, os transcritos primários dos genes codificadores de mRNA começam a servir como moldes de tradução antes mesmo de terem completado sua transcrição. Isso pode ocorrer porque o local de transcrição não é compartimentalizado em um núcleo como acontece em organismos eucarióticos. Assim, a transcrição e a tradução são acopladas em células procarióticos. Consequentemente, os mRNA de procarióticos são submetidos a pouco processamento antes de realizarem sua função planejada na síntese de proteínas. Com efeito, a regulação adequada de alguns genes (p. ex., o óperon *Trp*) depende desse acoplamento de transcrição e tradução. As moléculas de rRNA e tRNA de procariotos são transcritas em unidades consideravelmente maiores que a molécula final. Na verdade, muitas das unidades de transcrição de tRNA codificam mais de uma molécula de tRNA. Assim, em procariotos, o processamento dessas moléculas precursoras de rRNA e tRNA é necessário para a geração de moléculas funcionais maduras.

Quase todas as transcrições primárias de RNAs de eucariotos sofrem um processamento extenso entre o momento que são sintetizadas até o momento de sua última função, seja como mRNA, miRNA, ou como um componente da maquinaria de tradução, tais como rRNA ou tRNA. O processamento ocorre principalmente no interior do núcleo. Os processos de **transcrição, processamento do RNA, e mesmo o transporte do RNA a partir do núcleo, são altamente coordenados**. Com efeito, um coativador transcricional denominado SAGA, em leveduras, e P/CAF, em células humanas, "conecta" a ativação da transcrição ao processamento do RNA, recrutando um segundo complexo denominado TREX para o alongamento da transcrição, *splicing* e exportação nuclear. O TREX (exportador da transcrição) representa uma ligação molecular provável entre os complexos de alongamento da transcrição, a maquinaia de *splicing* de RNA e a exportação nuclear (ver **Figura 36-12**). Esse acoplamento, presumivelmente, aumenta muito tanto a fidelidade e taxa de processamento quanto o movimento do mRNA para o citoplasma para ser traduzido.

As porções codificadoras (éxons) da maioria dos genes de eucariotos são interrompidas por íntrons

Sequências de RNA que aparecem em RNAs maduros são denominadas **éxons**. Em genes que codificam mRNA, os éxons são frequentemente interrompidos por longas sequências de DNA que não aparecem no mRNA maduro e também não contribuem para

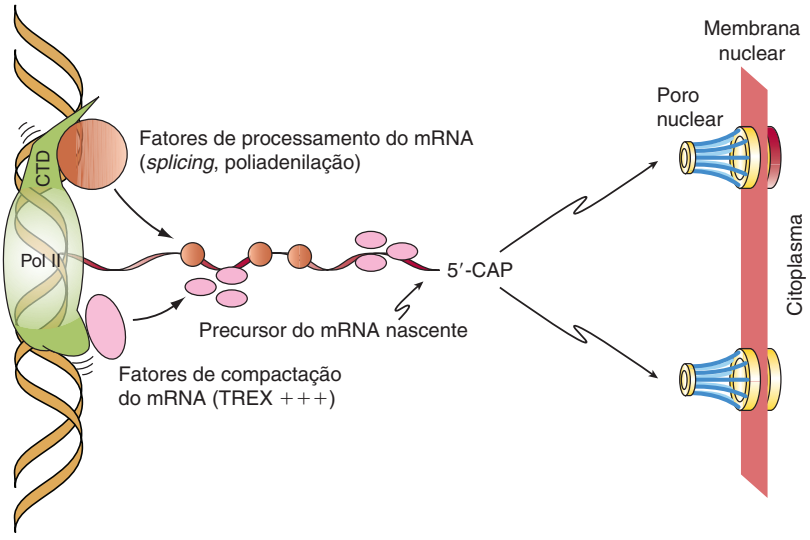


FIGURA 36-12 A transcrição gênica de mRNA mediada pela RNA-polimerase II é cotranscricionalmente acoplada ao processamento e transporte de RNA. É mostrada a RNA pol II transcrevendo ativamente um gene codificador de mRNA (alongamento de cima para baixo na figura). Fatores de processamento do RNA (i.e., fatores de *splicing* contendo motivos SR/RNP bem como fatores de poliadenilação e terminação) interagem com o domínio C-terminal (CTD) da pol II, enquanto fatores de compactação do mRNA, tais como o complexo THO/TREX, são recrutados ao transcrito primário de mRNA nascente seja por meio de interações pol II diretas, como mostrado, ou por interações com fatores SR/*splicing* residentes no mRNA nascente. Observe que o CTD não é desenhado em escala. O CTD da subunidade Rbp1 da pol II, evolutivamente conservado, é na realidade 5 a 10 vezes o comprimento da polimerase, devido às suas várias prolinas e consequente natureza não estruturada, representando, portanto, um significativo local de ancoragem para o processamento de RNA e proteínas de transporte. Em ambos os casos, as cadeias de mRNA nascentes são mais rapidamente e mais precisamente processadas devido ao rápido recrutamento desses vários fatores à cadeia crescente de mRNA (precursor). Após o processamento adequado de mRNA, o mRNA maduro é passado aos poros nucleares que pontuam a membrana nuclear, onde, em consequência do transporte através desses poros, os mRNA podem ser envolvidos por ribossomos e traduzidos em proteínas (Adaptada de Jensen et al: *Mol Cell.* 2005;11:1129–1138).

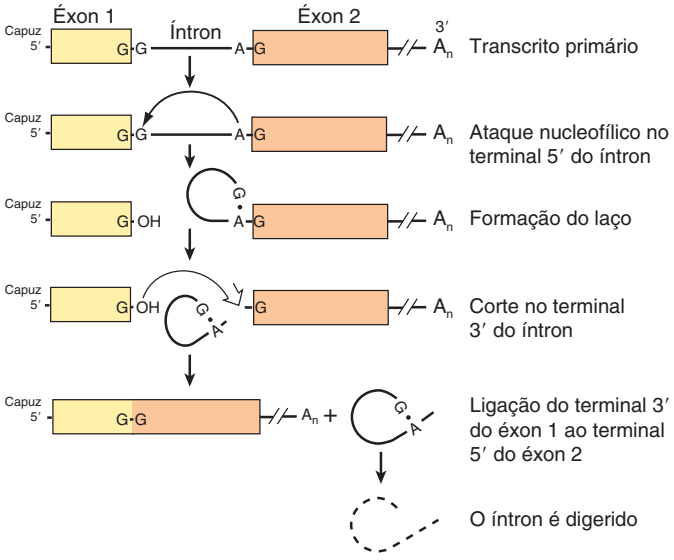


FIGURA 36-13 O processamento do transcrito primário para mRNA. Neste transcrito hipotético, o terminal 5′ (**esquerda**) do íntron é cortado (↓) e um laço se forma entre o G, no terminal 5′ do íntron, e um A, próximo do terminal 3′, na sequência de consenso UACUA**A**C. Esta sequência é chamada de *branch site* e é a sequência 3′ com mais **A** que forma a ligação 5′-2′ com o G. O terminal 3′ (**direita**) do íntron é então cortado (). Isto libera o laço, que é digerido, e o éxon 1 é unido ao éxon 2 nos resíduos de G.

a informação genética finalmente traduzida em uma sequência de aminoácidos de uma molécula de proteína (ver Capítulo 35). Na verdade, essas sequências frequentemente interrompem a região codificadora dos genes estruturais. Essas **sequências intervenientes**, ou **íntrons**, existem no interior da maioria, mas não de todos, os genes codificadores de mRNA de eucariotos superiores. Em genes codificadores de mRNAs humanos, os **éxons variam em cerca de 150 nt**, **enquanto os íntrons são muito mais heterogêneos**, **variando de 10 a 100 nt até 30.000 nucleotídeos em comprimento**. As sequências de íntrons de RNA são clivadas para fora do transcrito e os éxons da transcrição são adequadamente unidos em conjunto no núcleo, antes que a molécula resultante de mRNA apareça no citoplasma para a tradução (**Figuras 36-13** e **36-14**). Uma hipótese para essa organização de genes éxon-íntron é que os éxons, que frequentemente codificam um domínio de atividade ou o módulo funcional de uma proteína, representam um meio conveniente de misturar a informação genética, permitindo aos organismos testarem rapidamente os resultados da combinação de domínios funcionais de novas proteínas.

Os íntrons são removidos e os éxons são unidos por *splicing*

Diversos mecanismos de reação de *splicing* diferentes para a remoção de íntrons foram descritos. O mais frequentemente utilizado em células de eucariotos é descrito adiante. Embora as sequências de nucleotídeos nos íntrons de vários transcritos de eucariotos – e até aquelas no interior de um único transcrito – sejam muito heterogêneas, existem sequências razoavelmente conservadas em cada uma das duas junções de éxon-íntron (*splice*) e no ponto de ramificação, que está localizado de 20 a 40 nucleotídeos a montante do sítio 3′ do *splice* (ver as sequências de consenso na Figura 36-14). Um complexo multicomponente especial, o **spliceossomo**, está envolvido na conversão do transcrito primário em mRNA. Os spliceossomos são compostos pelo transcrito primário, cinco snRNA (U1, U2, U4, U5, e U6) e mais de 60 proteínas, muitas das quais contêm motivos conservados de proteínas "RNP" e "SR". Coletivamente, os cinco snRNA e as proteínas que contêm RNP/SR formam uma **ribonucleoproteína nuclear pequena denominada complexo snRNA**. É provável que esse spliceossomo penta-snRNP se forme antes da interação com os precursores de mRNA. Os snRNP posicionam os segmentos de RNA de éxons e íntrons para as reações de *splicing* necessárias. A reação de *splicing* se inicia com um corte na junção do éxon 5′ (doador, à esquerda) e o íntron (Figura 36-13). Isso é realizado por um ataque nucleofílico por um resíduo de adenilil na sequência ponto de ramificação localizada imediatamente acima da extremidade 3′ desse íntron. O terminal 5′ livre forma, a seguir, um circuito ou uma estrutura em laço que está ligada por uma ligação fosfodiéster 5′–2′ pouco comum a um A reativo na sequência do ponto de ramificação PyNPyPyPuAPy (Figura 36-14). Esse resíduo adenilil está geralmente localizado de 20 a 30 nucleotídeos a montante da extremidade 3′ do íntron a ser removido. O ponto de ramificação identifica o sítio do *splicing* 3′. Um segundo corte é feito na junção do íntron com o éxon 3′ (doador, à direita). Nessa segunda reação de transesterificação, a

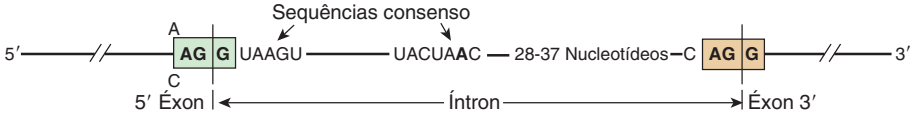


FIGURA 36-14 Sequências de consenso nas junções *splice*. As sequências 5′ (doador; **esquerda**) e 3′ (aceptor; **direita**) são mostradas. Também é mostrada a sequência de consenso da levedura (UACUA**A**C) para o ponto de ramificação. Em células de mamíferos, essa sequência consenso é PyNPyPyPuAPy, em que Py é uma pirimidina, Pu é uma purina e N é qualquer nucleotídeo. O ponto de ramificação está localizado de 20 a 40 nucleotídeos a montante do sítio 3′ de *splice*.

hidroxila 3′ do éxon a montante da molécula ataca o fosfato 5′ na fronteira do éxon–íntron mais abaixo na molécula e a estrutura em laço que contém o íntron é liberada e hidrolisada. Os éxons 5′ e 3′ se ligam para formar uma sequência contínua.

Os snRNP e proteínas associadas são necessários para a formação de várias estruturas e intermediários. O U1 no interior do complexo snRNP se liga primeiro pelo pareamento de bases, à fronteira 5′ éxon–íntron. O U2 no interior do complexo snRNP, se liga então, por meio do pareamento de bases, ao ponto de ramificação, e isso expõe o resíduo nucleofílico A. Os U4/U5/U6 no interior do complexo snRNP controlam um desenrolamento mediado por proteína dependente de ATP que resulta em uma ruptura do complexo de bases pareadas U4–U6 com a liberação de U4. O U6 é, então, capaz de interagir primeiro com o U2 e, a seguir, com o U1. Essas interações servem para aproximar o sítio de *splice* 5′, o ponto de ramificação com seu A reativo e o sítio de *splice* 3′. Esse alinhamento é intensificado por U5. O processo também resulta na formação do circuito ou estrutura em laço. As duas extremidades são clivadas, provavelmente pelos U2–U6 no interior do complexo snRNP. O U6 é certamente essencial, uma vez que as leveduras deficientes nesse snRNA não são viáveis. É importante notar que o RNA funciona como um agente catalítico. Essa sequência de eventos é, então, repetida em genes que contêm múltiplos íntrons. Nesses casos, um padrão definitivo é seguido por cada gene, embora os íntrons não sejam necessariamente removidos na sequência -1, depois 2, depois 3, etc.

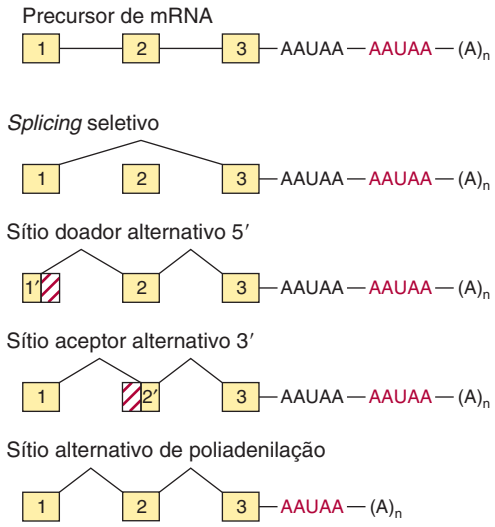


FIGURA 36-15 Mecanismos de processamento alternativo dos precursores de mRNA. Esta forma de processamento de mRNA envolve a inclusão seletiva ou exclusão de éxons, o uso de sítios alternativos doadores 5′ ou aceptores 3′ e o uso de diferentes sítios de poliadenilação.

O *splicing* alternativo proporciona diferentes mRNA

O processamento das moléculas de mRNA é um local para a expressão gênica. Os padrões alternativos de *splicing* de mRNA resultam de mecanismos adaptativos específicos de tecidos e de mecanismos de controle do desenvolvimento. Curiosamente, estudos recentes sugerem que o *splicing* alternativo é controlado, pelo menos em parte, por marcações epigenéticas de cromatina (i.e., Tabela 35-1). Essa forma de acoplamento da transcrição ao processamento do mRNA pode ser mediada cineticamente e/ou por interações entre histonas específicas PTM e fatores de *splicing* alternativo que podem carregar nos transcritos nascentes do gene de mRNA durante o processo de transcrição (Figura 36-12).

Como mencionado anteriormente, a sequência de eventos do *splicing* de éxon-íntron geralmente segue uma ordem hierárquica para um determinado gene. O fato de várias estruturas de RNA complexas serem formadas durante o *splicing* – e que alguns mRNA e proteínas estejam envolvidos – oferece inúmeras possibilidades para uma mudança dessa ordem e para a geração de diferentes mRNA. Do mesmo modo, a utilização de sítios alternativos de poliadenilação de terminação – clivagem também resulta em variabilidade no mRNA. Alguns exemplos esquemáticos desses processos, todos ocorrendo na natureza, são mostrados na **Figura 36-15**.

***Splicing* defeituosos podem provocar doenças**. Pelo menos uma forma de β-talassemia, uma doença na qual ocorre uma severa subexpressão do gene da globina β da hemoglobina, parece resultar da troca de um nucleotídeo na junção éxon-íntron, impedindo a remoção do íntron e, portanto, levando a uma diminuição ou ausência da síntese da cadeia β da proteína. Isto se deve ao fato de que a sequência de leitura da tradução normal do mRNA é interrompida por um defeito no processo fundamental de *splicing* do RNA, ressaltando a precisão que esse processo de *splicing* RNA–RNA deve manter.

A utilização do promotor alternativo proporciona uma forma de regulação

A regulação da expressão do gene tecido-específica pode ser fornecida por *splicing* alternativo, como observado anteriormente, pelos elementos de controle no promotor ou pelo uso de promotores alternativos. O gene da glicoquinase (*GK*) é composto por 10 éxons intercalados por 9 íntrons. A sequência de éxons 2–10 é idêntica nas células β pancreáticas e hepáticas, os principais tecidos que expressam a proteína *GK*. A expressão do gene *GK* é regulada do modo muito diferente – por dois tipos de promotores – nesses dois tecidos. O promotor hepático e o éxon 1L estão localizados próximos aos éxons 2–10; o éxon 1L está ligado diretamente ao éxon 2. Por outro lado, o promotor das células β pancreáticas está localizado cerca de 30 kbp a montante. Neste caso, a fronteira 3′ do éxon 1B está ligada à fronteira 5′ do éxon 2. O promotor hepático e o éxon 1L são excluídos e removidos durante a reação de *splicing* (ver **Figura 36-16**). A existência de múltiplos promotores distintos permite padrões de expressão celulares e teciduais específicos de um gene específico (mRNA). No caso do *GK*, a insulina e o AMPc (Capítulo 42) controlam a transcrição de *GK* no fígado, enquanto a glicose controla a expressão de *GK* nas células β.

Os RNA ribossomais e a maior parte dos RNA transportadores são processados a partir de precursores maiores

Em células de mamíferos, as três moléculas de rRNA (28S, 18S, 5,8S) são transcritas como parte de uma única grande molécula precursora de 45S. **O precursor é subsequentemente processado no nucléolo** para fornecer esses três componentes de RNA para as

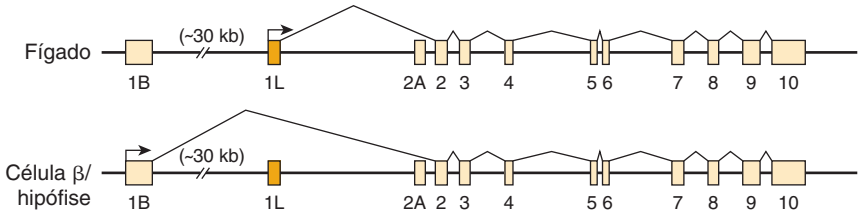


FIGURA 36-16 Uso de promotor alternativo nos genes da glucoquinase (*GK*) nas células do fígado e nas células β pancreáticas. A regulação diferencial do gene da glucoquinase é feita por meio do uso de promotores teciduais específicos. O gene promotor *GK* das células β e o éxon 1B estão localizados cerca de 30kbp acima do promotor do fígado e do éxon 1L. Cada promotor tem uma estrutura única e é regulado diferentemente. Os éxons 2-10 são idênticos nos dois genes e as proteínas *GK* codificadas pelos mRNAs das células hepáticas e células β têm propriedades cinéticas idênticas.

subunidades de ribossomos encontradas no citoplasma. Os genes de rRNA estão localizados nos nucléolos das células de mamíferos. Centenas de cópias desses genes estão presentes em cada célula. Esse grande número de genes é necessário para sintetizar cópias suficientes de cada tipo de rRNA para formar os 10^7 ribossomos necessários para cada replicação celular. Enquanto uma única molécula de mRNA pode ser copiada em 10^5 moléculas de proteínas, proporcionando uma grande amplificação, os rRNAs são produtos finais. Essa ausência de amplificação requer um grande número de genes e uma alta taxa de transcrição, geralmente sincronizados com a taxa de crescimento celular. Da mesma forma, os tRNAs são frequentemente sintetizados como precursores, com sequências extras tanto de sequências 5′ quanto 3′ compondo o tRNA maduro. Uma pequena fração de tRNA contém íntrons.

OS RNA PODEM SER EXTENSIVAMENTE MODIFICADOS

Essencialmente, todos os RNAs são modificados de modo covalente após a transcrição. Está claro que pelo menos algumas dessas modificações são reguladoras.

O RNA mensageiro é modificado nas extremidades 5′ e 3′

Como mencionado anteriormente, as moléculas de mRNA de mamíferos contêm uma estrutura de capuz de 7-metilguanosina nos seus terminais 5′ (Figura 34-10) e a maioria possui uma cauda poli(A) no terminal 3′. A estrutura de capuz é adicionada à extremidade 5′ do precursor de mRNA recentemente transcrito no núcleo, previamente ao transporte da molécula de mRNA para o citoplasma. O **capuz 5′** do transcrito de RNA é necessária tanto para o início da tradução eficaz quanto para a proteção da extremidade 5′ do mRNA de ataques de exonucleases 5′ → 3′. Entre as metilações secundárias das moléculas de mRNA, aquelas em 2′-hidroxi e N_7 dos resíduos de adenilil ocorrem após a molécula de mRNA aparecer no citoplasma.

As caudas de poli(A) são adicionadas à extremidade 3′ das moléculas de mRNA em uma etapa de processamento pós-transcrição. O mRNA é inicialmente clivado em cerca de 20 nucleotídeos a jusante da sequência de reconhecimento, AAUAA. Outra enzima, a **polimerase poli(A)**, adiciona uma cauda de poli(A) que é subsequentemente estendida em até 200 resíduos A. A **cauda de poli(A)** parece proteger a extremidade 3′ do mRNA do ataque das exonucleases 3′ → 5′ e facilitar a tradução. A presença ou ausência da cauda poli(A) não determina se uma molécula precursora no núcleo aparece no citoplasma, porque todas as moléculas de mRNA nuclear com cauda de poli(A) não contribuem para o mRNA citoplasmático, nem todas as moléculas de mRNA citoplasmáticos contêm caudas de poli(A) (mRNA de histonas são as mais notáveis nesse sentido). Após o transporte nuclear, as enzimas citoplasmáticas em células de mamíferos podem tanto adicionar quanto remover os resíduos de adenilil das caudas de poli(A); esse processo tem sido associado a uma alteração da estabilidade e da capacidade de tradução do mRNA.

O tamanho de algumas moléculas de mRNA citoplasmático, mesmo após a remoção da cauda de poli(A), é ainda consideravelmente maior que o tamanho necessário para codificar proteínas específicas, para as quais elas são os moldes, frequentemente por um fator de 2 ou 3 vezes. **Os nucleotídeos extras ocorrem em regiões não traduzidas (codificação não proteica)** tanto na sequência 5′ ou 3′ da região de codificação; as sequências não traduzidas mais longas estão geralmente na extremidade 3′. As funções exatas das sequências **UTR 5′** e **UTR 3′** são desconhecidas, mas elas têm sido implicadas no processamento, no transporte, no armazenamento, na degradação e na tradução do RNA; cada uma dessas reações potencialmente contribui para níveis adicionais de controle da expressão gênica. **Os microRNA geralmente têm como alvo as sequências no interior do UTR 3′**. Muitos desses eventos pós-transcrição envolvendo mRNA ocorrem em organelas citoplasmáticas denominadas corpos P (Capítulo 37).

Os microRNA são derivados de grandes transcritos primários por processamento nucleolítico específico

A maioria dos RNAmi são transcritos pela RNA pol II em **transcritos primários** denominados **pri-miRNA**. Os priRNAmi têm o capuz 5′ e são 3′poliadenilados (**Figura 36-17**). Os priRNAmi são sintetizados a partir de unidades de transcrição que codificam um ou vários miRNAs diferentes; essas unidades de transcrição estão localizadas independentemente no genoma ou no interior do DNA intrônico de outros genes. Os genes codificadores de miRNA devem, portanto, minimamente possuir um promotor, uma região codificadora e sinais de poliadenilação/término distintos. Os pri-miRNA possuem uma estrutura secundária extensa, e esta estrutura intramolecular é mantida após processamento pela **nuclease**

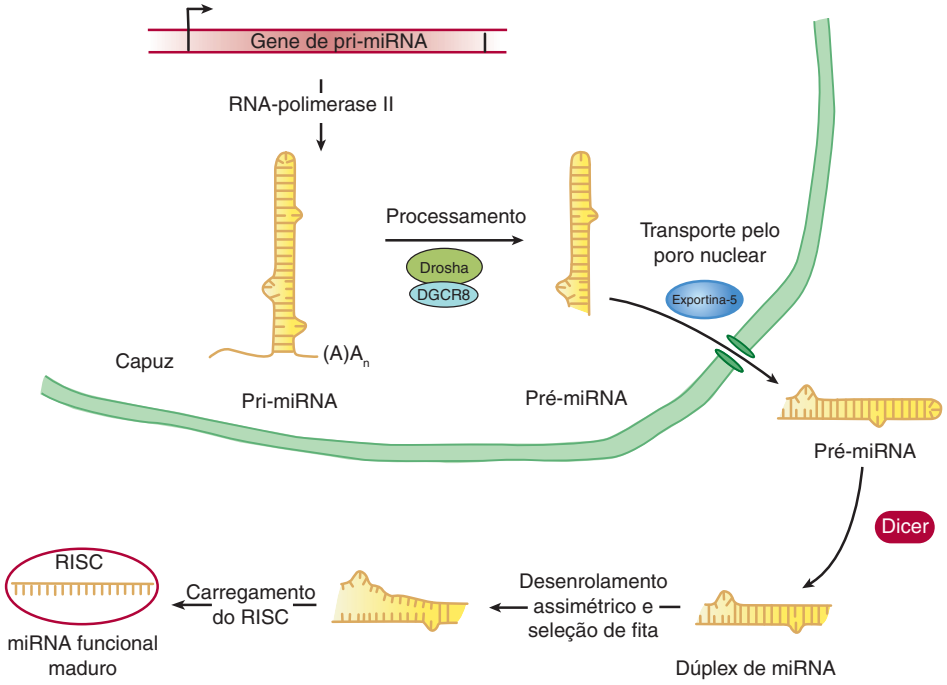


FIGURA 36-17 Biogênese dos miRNA. Os genes codificadores de miRNA são transcritos pela RNA pol II em um transcrito primário de miRNA (pri-miRNA), o qual tem o capuz 5′ e é poliadenilado como é típico dos transcritos primários codificadores de mRNA. Esse pri-miRNA é submetido a processamento no interior do núcleo pela ação da nuclease Drosha-DGCR8, que remove sequências tanto da extremidade 5′ quanto da 3′, gerando o pré-miRNA. Esse RNA de fita dupla parcialmente processado é transportado pelo poro nuclear pela exportina-5. O pré-miRNA citoplásmico é então cortado ainda mais pela ação da nuclease de múltiplas subunidades chamada de *Dicer* para formar o dúplex de miRNA. Uma das duas fitas de RNA de 21 a 22 nucleotídeos de comprimento é selecionada, o dúplex desenrolado e a fita selecionada carregada para o complexo RISC, gerando, assim, o miRNA maduro, funcional.

Drosha-DGCR8; a porção que contém o grampo de RNA é preservada, transportada pelo poro nuclear e, uma vez no citoplasma, adicionalmente processada para um **21 ou 22-mer** pela **nuclease *dicer***. Finalmente, uma das duas fitas é selecionada para ser carregada para o **RISC**, ou **complexo silenciador induzido por RNA** para formar um miRNA maduro e funcional. Os siRNAs são produzidos do mesmo modo. Uma vez no complexo RISC, os miRNA podem modular o mRNA funcional (ver Capítulo 39). Dados recentes sugerem que os genes reguladores que codificam o miRNA podem se ligados e, portanto, coevoluir com seus genes alvo.

A editoração de RNA altera o mRNA após a transcrição

O dogma central afirma que para um determinado gene e produto gênico há uma relação linear entre a sequência codificadora no DNA, a sequência do mRNA e a sequência de proteína (Figura 35-7). Alterações na sequência de DNA deveriam se refletir em uma mudança na sequência de mRNA e, dependendo do códon utilizado, na sequência de proteína. Entretanto, exceções a esse dogma foram recentemente documentadas. A informação codificadora pode ser alterada no nível do mRNA por uma **edição do RNA**. Em tais casos, a sequência de codificação de mRNA difere da sequência do DNA cognato. Um exemplo é o gene da apolipoproteína B (*apoB*) e o mRNA. No fígado, um único gene de *apoB* é transcrito em um mRNA que direciona a síntese de uma proteína de 100 kDa, a apoB100. No intestino, o mesmo gene direciona a síntese do transcrito primário; entretanto, uma citidina desaminase converte um códon CAA no mRNA em UAA em um único sítio específico. Em vez de codificar glutamina, esse códon se torna um sinal de terminação e o resultado é uma proteína de 48 kDa (apoB48). A apoB100 e a apoB48 têm funções diferentes nos dois órgãos. Um número crescente de outros exemplos incluem mudança de glutamina para arginina no receptor de glutamato e várias mudanças em mRNA mitocondriais de tripanossoma, geralmente envolvidos na adição ou deleção de uridina. A extensão exata da edição de RNA é desconhecida, mas estimativas correntes sugerem que $< 0{,}01\%$ dos mRNAs são editados desse modo. Recentemente, a edição de miRNA foi descrita sugerindo que essas duas formas de mecanismos de controle transcricionais poderiam contribuir cooperativamente para a regulação do gene.

O RNA transportador é extensamente processado e modificado

Como descrito nos Capítulos 34 e 37, as moléculas de tRNA servem como moléculas adaptadoras para a tradução do mRNA em sequências de proteínas. Os tRNAs contêm muitas modificações de bases padrão A, U, G e C, incluindo metilação, redução, desaminação e rearranjo de pontes glicosídicas. Modificações pós-transcrição adicionais incluem alquilações de nucleotídeos e a ligação do Cp-CpA_{OH} terminal característico à extremidade 3′ da molécula pela enzima nucleotidiltransferase. O 3′ OH da ribose A é o ponto de ligação para o aminoácido específico que entra na reação de poli-

merização da síntese de proteína. A metilação dos precursores de tRNA de mamíferos provavelmente ocorre no núcleo, enquanto a clivagem e a ligação do $CpCpA_{OH}$ são funções citoplasmáticas, uma vez que os terminais se renovam de posição mais rapidamente que as próprias moléculas de tRNA. As enzimas no interior do citoplasma das células de mamíferos são necessárias para a ligação dos aminoácidos aos resíduos de $CpCpA_{OH}$ (ver Capítulo 37).

O RNA PODE ATUAR COMO CATALISADOR

Além da ação catalítica dos snRNAs na formação do mRNA, diversas outras funções enzimáticas foram atribuídas ao RNA. As **ribozimas** são moléculas de RNA com atividade catalítica. Esta atividade geralmente envolve as reações de transesterificação, e a maior parte está envolvida com o metabolismo de RNA (*splicing* e endorribonuclease). Recentemente, um componente de rRNA foi implicado na hidrólise de um éster de aminoacil e, portanto, desempenha um papel central no funcionamento da ponte de peptídeos (peptidiltransferases; ver Capítulo 37). Essas observações, feitas utilizando moléculas de RNA derivadas de organelas de plantas, leveduras, vírus e células de eucariotos superiores, mostram que o RNA pode atuar como uma enzima, e revolucionaram as ideias sobre a atuação das enzimas e sobre a própria origem da vida.

RESUMO

- O RNA é sintetizado a partir de um molde de DNA pela enzima RNA-polimerase.
- Enquanto bactérias contêm uma única RNA-polimerase (β, $\beta' \alpha_2$), há três RNA-polimerases nucleares diferentes em mamíferos: RNA-polimerase I, II e III. Essas enzimas catalisam a transcrição dos genes codificadores de rRNA (Pol I), mRNA/miRNA (Pol II), e tRNA e 5S rRNA (Pol III).
- As RNA-polimerases interagem com as regiões únicas dos genes *cis*-ativos, denominadas promotores, para formar complexos de pré-iniciação (PICs) capazes de iniciação. Em eucariotos, o processo de formação do PIC pela pol II necessita, além da polimerase, de múltiplos fatores de transcrição gerais (GTF), TFIIA, B, D, E, F e H.
- A formação do PIC em eucariotos pode ocorrer em promotores acessíveis passo a passo – por interações ordenadas e sequenciais de GTFs e RNA-polimerase com os promotores de DNA – ou em uma única etapa, por meio do reconhecimento do promotor pelo complexo pré-formado da holoenzima GTF-RNA-polimerase.
- A transcrição ocorre em três fases: iniciação, alongamento e terminação. Todas são dependentes de elementos *cis* distintos de DNA e podem ser moduladas por diferentes fatores proteicos *trans*-ativos.
- A presença de nucleossomos pode impedir a ligação tanto dos transfatores quanto da maquinaria de transcrição aos seus elementos *cis* de DNA cognatos, inibindo, portanto, a transcrição.
- A maioria dos RNAs de eucariotos é sintetizada na forma de precursores que contêm sequências em excesso, as quais são removidas antes da geração do RNA funcional maduro. Essas reações de processamento fornecem etapas potenciais adicionais para a regulação da expressão gênica.
- A síntese do mRNA em eucariotos resulta em um precursor pré-mRNA que contém grandes quantidades de RNA em excesso (íntrons) que devem ser removidos com precisão por *splicing* de RNA para gerar o mRNA funcional traduzível composto de sequências codificadoras de éxons e sequências não codificadoras 5′ e 3′.
- Todas as etapas – das alterações no molde de DNA, na sequência e na acessibilidade na cromatina para a estabilidade e capacidade de tradução do RNA – estão sujeitas à modulação e, portanto, são sítios de controle potencial para a regulação de genes de eucariotos.

REFERÊNCIAS

Bourbon H-M, Aguilera A, Ansari AZ, et al: A unified nomenclature for protein subunits of mediator complexes linking transcriptional regulators to RNA polymerase II. Mol Cell 2004;14:553.

Busby S, Ebright RH: Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. Cell 1994;79:743.

Cramer P, Bushnell DA, Kornberg RD: Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. Science 2001;292:1863.

Fedor MJ: Ribozymes. Curr Biol 1998;8:R441.

Gott JM, Emeson RB: Functions and mechanisms of RNA editing. Ann Rev Genet 2000;34:499.

Harel-Sharvit L, Eldad N, Haimovich G, et al: RNA polymerase II subunits link transcription and mRNA decay to translation. Cell 2010;143:552–563.

Kawauchi J, Mischo H, Braglia P, et al: Budding yeast RNA polymerases I and II employ parallel mechanisms of transcriptional termination. Genes Dev 2008;22:1082.

Keaveney M, Struhl K: Activator-mediated recruitment of the RNA polymerase machinery is the predominant mechanism for transcriptional activation in yeast. Mol Cell 1998;1:917.

Maniatis T, Reed R: An extensive network of coupling among gene expression machines. Nature 2002;416:499.

Mapendano CK, Lykke-Andersen S, Kjems J, et al: Crosstalk between mRNA 3′ end processing and transcription initiation Mol Cell 2010;40:410–422.

Nechaev S, Adelman K: Pol II waiting in the starting gates: regulating the transition from transcription initiation into productive elongation. Biochim Biophys Acta 2011;1809:34–45.

Orphanides G, Reinberg D: A unified theory of gene expression. Cell 2002;108:439.

Price DH: Poised polymerases: on your mark ... get set ... go!. Mol Cell 2008;30:7.

Reed R, Cheng H: TREX, SR proteins and export of mRNA. Curr Opin Cell Biol 2005;17:269.

Trcek T, Singer RH: The cytoplasmic fate of an mRNP is determined cotranscriptionally: exception or rule? Genes Dev 2010; 24:1827–1831.

Tucker M, Parker R: Mechanisms and control of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae.* Ann Rev Biochem 2000;69:571.

West S, Proudfoot NJ, Dye MJ, et al: Molecular dissection of mammalian RNA polymerase II transcriptional termination. Mol Cell 2008;29:600.

CAPÍTULO

37

A Síntese de Proteínas e o Código Genético

P. Anthony Weil, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Compreender que o código genético é um código de três letras de nucleotídeos que está codificado em uma ordem linear do DNA éxon (composto de trincas de A, G, C e T) de genes codificadores de proteínas, e que esse código de três letras é traduzido em mRNA (composto de trincas de A, G, C e U) para especificar a ordem linear de adição de aminoácidos durante a síntese proteica por meio do processo de tradução.
- Entender que o código genético universal é degenerado, não ambíguo, não sobreposto e sem pontuação.
- Explicar que o código genético é composto por 64 códons, 61 dos quais codificam aminoácidos, enquanto três induzem a terminação da síntese de proteínas.
- Especificar como os RNA transportadores (tRNA) funcionam como agentes de informação final que decodifica o código genético de mRNA.
- Depreender o mecanismo do processo energético intenso de síntese proteica que ocorre nos complexos proteicos de RNA denominados ribossomos.
- Reconhecer que a síntese de proteínas, como a replicação e transcrição do DNA, é controlada com precisão pela ação de múltiplos fatores acessórios que são responsáveis por múltiplos estímulos de sinalização reguladora extra e intracelulares.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

As letras A, G, T e C correspondem aos nucleotídeos encontrados no DNA. No interior dos genes codificadores de proteínas, esses nucleotídeos estão organizados em palavras-código de três letras chamadas de **códons**, e o conjunto desses códons constitui o **código genético**. Era impossível compreender a síntese proteica – ou explicar as mutações – antes do código genético ser elucidado. O código fornece uma base para explicar o modo pelo qual os defeitos nas proteínas podem provocar doenças genéticas e para explicar o diagnóstico e, talvez, tratamento desses distúrbios. Além disso, a fisiopatologia de muitas infecções virais está relacionada com a capacidade desses agentes infecciosos em interromper a síntese de proteínas celulares do hospedeiro. Muitos medicamentos antibacterianos são eficazes porque seletivamente interrompem a síntese proteica na célula da bactéria invasora, mas não afetam a síntese proteica nas células de eucariotos.

A INFORMAÇÃO GENÉTICA PASSA DO DNA PARA O RNA E PARA A PROTEÍNA

A informação genética no interior da sequência de nucleotídeos de DNA é transcrita no núcleo para a sequência de nucleotídeos específica de uma molécula de RNA. A sequência de nucleotídeos no transcrito de RNA é complementar à sequência de nucleotídeos da fita-molde de seu gene, de acordo com as regras de pareamento de bases. Muitas classes diferentes de RNA se combinam para dirigir a síntese de proteínas.

Em procariotos, há uma correspondência linear entre o gene, o **RNA mensageiro (mRNA)** transcrito a partir do gene e o produto polipeptídeo. A situação é mais complicada em células de eucariotos superiores, nas quais o transcrito primário é muito maior que o mRNA maduro. Os grandes precursores de mRNA contêm regiões codificadoras (**éxons**) que irão formar o mRNA maduro e longas sequências de intervenção (**íntrons**) que separam os éxons. O mRNA é processado no interior do núcleo, e os íntrons, que

constituem muito mais desse RNA que os éxons, são removidos. Os éxons são ligados em conjunto para formar o mRNA maduro, que é transportado para o citoplasma, onde é traduzido em proteína.

A célula deve possuir a maquinaria necessária para traduzir a informação com precisão e eficácia, a partir da sequência de nucleotídeos do mRNA para a sequência de aminoácidos da proteína específica correspondente. O esclarecimento da nossa compreensão desse processo, denominado **tradução**, esperava pela decifração do código genético. Compreendeu-se logo que as moléculas de mRNA em si não possuem afinidade por aminoácidos e, portanto, que a tradução da informação da sequência de nucleotídeos do mRNA para a sequência de aminoácidos de uma proteína necessita de uma molécula adaptadora intermediária. Essa molécula adaptadora deve reconhecer, por um lado, a sequência de nucleotídeos específica, bem como um aminoácido específico por outro. Com tal molécula adaptadora, a célula pode direcionar um aminoácido específico para a posição sequencial adequada de uma proteína durante a sua síntese, como determinado pela sequência de nucleotídeos do mRNA específico. De fato, os grupos funcionais dos aminoácidos em si não entram em contato com o molde de mRNA.

A SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DE UMA MOLÉCULA DE mRNA CONTÉM UMA SÉRIE DE CÓDONS QUE ESPECIFICAM A SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA CODIFICADA

Vinte aminoácidos diferentes são necessários para a síntese do complemento celular de proteínas; assim, devem existir pelo menos 20 códons diferentes que constituem o código genético. Uma vez que só existem quatro nucleotídeos diferentes no mRNA, cada códon deve ser composto por mais do que um único nucleotídeo de purina ou pirimidina. Códons que consistem em dois nucleotídeos cada poderiam fornecer apenas 16 (4^2) códons específicos, enquanto os códons de três nucleotídeos fornecem 64 (4^3) códons específicos.

É atualmente conhecido que cada códon é composto por uma sequência de três nucleotídeos; isto é, **é um código de trincas** (ver **Tabela 37-1**). A decifração inicial do código genético dependeu muito da síntese *in vitro* dos polímeros de nucleotídeos, particularmente as trincas em sequência repetida. Essas trincas de ribonucleotídeos sintéticos foram utilizados como mRNA para programar a síntese de proteínas no tubo de ensaio, e permitiu aos pesquisadores decifrarem o código genético.

O CÓDIGO GENÉTICO É DEGENERADO, NÃO AMBÍGUO, NÃO SOBREPOSTO, SEM PONTUAÇÃO E UNIVERSAL

Três dos 64 códons possíveis não codificam aminoácidos específicos; estes foram denominados de **códons sem sentido** (***nonsense***). Estes códons sem sentido são utilizados na célula como **sinais de terminação**; eles especificam onde a polimerização de aminoácidos em uma molécula de proteína deve parar. **Os 61 códons restantes codificam os 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente** (Tabela 37-1). Assim, há "**degeneração**" no código genético, isto é, múltiplos códons decodificam o mesmo aminoácido. Alguns aminoácidos são codificados por vários códons; por exemplo, seis códons diferentes UCU, UCC, UCA, UCG, AGU e AGC especificam a serina. Outros aminoácidos, como a metionina e o triptofano, possuem um único códon. Em geral, o terceiro nucleotídeo em um códon é menos importante que os dois primeiros na determinação do aminoácido específico a ser incorporado, e isso é responsável pela maior parte da degeneração do código. Entretanto, para qualquer códon específico, apenas um único aminoácido é indicado; com raras exceções, o código genético é **não ambíguo** – isto é, dado um códon específico, apenas um único aminoácido é indicado. A **distinção entre ambiguidade e degeneração é um conceito importante**.

O código não ambíguo, mas degenerado, pode ser explicado em termos moleculares. O reconhecimento de códons específicos no mRNA pelas moléculas adaptadoras de tRNA é dependente de sua **região anticódon** e das regras de pareamento de bases. Cada molécula de tRNA contém uma sequência específica,

TABELA 37-1 O código[1] genético (atribuições dos códons em RNAs mensageiros de mamíferos)

Primeiro nucleotídeo	Segundo nucleotídeo				Terceiro nucleotídeo
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Term	Term[2]	A
	Leu	Ser	Term	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile[2]	Thr	Lys	Arg[2]	A
	Met	Thr	Lys	Arg[2]	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

[1] Os termos primeiro, segundo e terceiro nucleotídeos se referem aos nucleotídeos individuais de um códon triplo lido na direção 5′-3′, da esquerda para a direita. A, nucleotídeo adenina; C, nucleotídeo citosina; G, nucleotídeo guanina; Term, códon de término da cadeia; U, nucleotídeo uridina. AUG, que codifica Met, serve como códon iniciador nas células de mamíferos e também codifica metioninas internas em uma proteína (as abreviações dos aminoácidos são explicadas no Capítulo 3).
[2] Nas mitocôndrias de mamíferos, AUA codifica Met, UGA codifica Trp e AGA e AGG servem como terminadores de cadeia.

complementar para um códon, que é denominada de anticódon. Para um determinado códon no mRNA, apenas uma única espécie de molécula de tRNA possui o anticódon certo. Uma vez que cada molécula de tRNA pode ser carregada com apenas um aminoácido específico, cada códon especifica, portanto, apenas um aminoácido. Entretanto, algumas moléculas de tRNA podem utilizar o anticódon para reconhecer mais de um códon. **Com raras exceções, considerando um códon específico, apenas um aminoácido específico será incorporado – embora, dado um aminoácido específico, mais de um códon possa ser utilizado.**

Como discutido posteriormente, a leitura do código genético durante o processo de síntese de proteínas não envolve qualquer sobreposição de códons. **Assim, o código genético não é sobreposto**. Além disso, uma vez a leitura iniciada em um códon específico, **não há pontuação** entre os códons, e a mensagem é lida em uma sequência contínua de trincas de nucleotídeos até que um códon de parada de tradução seja alcançado.

Até recentemente, pensava-se que o código genético fosse universal. Atualmente, foi demonstrado que o conjunto de moléculas de tRNA nas mitocôndrias (que contêm seus próprios conjuntos de maquinários de tradução separados e distintos) de eucariotos inferiores e superiores, incluindo os humanos, leem quatro códons diferentes das moléculas de tRNA no citoplasma, até mesmo nas mesmas células. Como observado na Tabela 37-1, o códon AUA é lido como Met, e UGA codifica Trp em mitocôndrias de mamíferos. Além disso, nas mitocôndrias, os códons AGA e AGG são lidos como códons de parada ou terminadores de cadeia, em vez de serem lidos como Arg. Como resultado das alterações específicas dessas organelas no código genético, as mitocôndrias precisam de apenas 22 moléculas de tRNA para lerem o seu código genético, enquanto o sistema de tradução citoplasmático possui um complemento completo de 31 espécies de tRNA. Salientadas essas exceções, **o código genético é universal**. A frequência de utilização de cada códon de aminoácido varia consideravelmente entre espécies e entre os diferentes tecidos dentro de uma mesma espécie. Os níveis específicos de tRNA geralmente espelham essas variações na utilização de códons. Assim, um códon particular utilizado abundantemente é decodificado por tRNA específico, da mesma forma abundante, que reconhece esse códon em particular. Tabelas de **utilização dos códons** estão se tornando mais precisas, à medida que mais genes e genomas são sequenciados; tal informação pode ser vital para a produção em larga escala de proteínas para fins terapêuticos (p. ex., insulina, eritropoietina). Tais proteínas são frequentemente produzidas em células não humanas utilizando a tecnologia de DNA recombinante (Capítulo 39). As características principais do código genético são listadas na **Tabela 37-2**.

TABELA 37-2 Características do código genético

• Degenerado
• Não ambíguo
• Não sobreposto
• Sem pontuação
• Universal

PELO MENOS UMA ESPÉCIE DE RNA TRANSPORTADOR (tRNA) EXISTE PARA CADA UM DOS 20 AMINOÁCIDOS

As moléculas de tRNA apresentam funções extraordinariamente semelhantes e estruturas tridimensionais. A função de adaptador das moléculas de tRNA exigem o carregamento de cada tRNA específico com seu aminoácido específico. Uma vez que não há afinidade dos ácidos nucleicos com os grupos de aminoácidos funcionais específicos, esse reconhecimento deve ser feito por uma molécula de proteína capaz de reconhecer tanto uma molécula de tRNA específica quanto um aminoácido específico. Pelo menos 20 enzimas específicas são necessárias para essas funções de reconhecimento específico e para a ligação correta dos 20 aminoácidos às moléculas de tRNA específicas. O processo de **reconhecimento e de ligação (carregamento)** que demanda energia acontece em duas etapas e é catalisado por uma enzima para cada um dos 20 aminoácidos. Estas enzimas são denominadas **aminoacil-tRNA sintetases**. Elas formam um complexo ativado intermediário aminoacil-AMP-enzima (**Figura 37-1**). O complexo específico da enzima aminoacil-AMP, então, reconhece um tRNA específico, ao qual ele anexa a porção aminoacila ao terminal 3′-hidroxila-

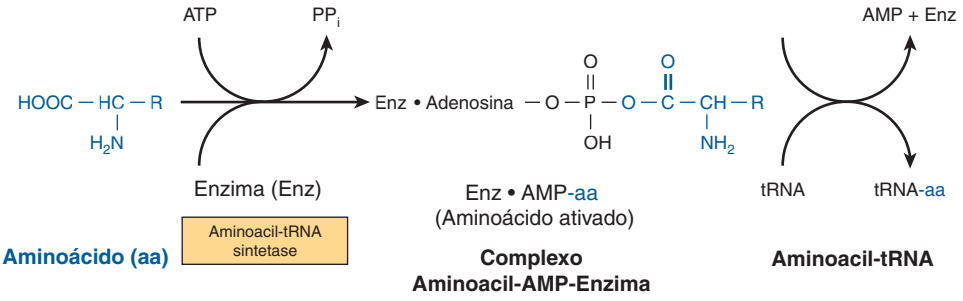


FIGURA 37-1 Formação do aminoacil-tRNA. Uma reação em duas etapas envolvendo a enzima aminoacil-tRNA sintetase resulta na formação do aminoacil-tRNA. A primeira reação envolve a formação de um complexo aminoacil-AMP-enzima. Esse aminoácido ativado é em seguida transferido para a molécula de tRNA correspondente. O AMP e a enzima são liberados, e o último pode ser reutilizado. As reações de carregamento têm uma taxa de erro (p. ex., esterificação do aminoácido incorreto no $tRNA_x$) de menos de 10^{-4}.

adenosil. As reações de carregamento têm uma taxa de erro de menos de 10^{-4} e, assim, são bastante precisas. O aminoácido permanece ligado ao seu tRNA específico em uma ligação éster até ser polimerizado em uma posição específica na fabricação de um polipeptídeo precursor de uma molécula de proteína.

As regiões da molécula de tRNA referidas no Capítulo 34 (e ilustradas na Figura 34–11) agora se tornam importantes. O braço ribotimidinapseudo-uridinacitidina (TψC)está envolvida na ligação do aminoacil-tRNA à superfície ribossomal no local de síntese de proteínas. O braço D é um dos sítios importantes para o reconhecimento adequado de uma determinada espécie de tRNA por sua aminoacil-tRNA sintetase adequada. O braço aceptor, localizado no terminal 3′-hidroxila-adenosil, é o sítio de ligação do aminoácido específico.

A região do anticódon é composta por sete nucleotídeos, e ela reconhece o códon de três letras no mRNA (**Figura 37-2**). A sequência lida a partir da direção 3′–5′ na alça do anticódon consiste em uma base variável de purina modificada-XYZ-pirimidina-pirimidina-5′. Observe que essa direção de leitura do anticódon é 3′–5′, enquanto o código genético na Tabela 37-1 é lido na direção 5′–3′, uma vez que o códon e a alça do anticódon das moléculas de mRNA e tRNA, respectivamente, são **antiparalelos** em suas complementaridades, assim como todas as outras interações intermoleculares entre as fitas de ácido nucleico.

A degeneração do código genético reside principalmente no último nucleotídeo do códon em trinca, sugerindo que o pareamento de bases entre este último nucleotídeo e o nucleotídeo correspondente do anticódon não segue estritamente a regra de Watson-Crick. Isso é chamado de **oscilação** (*wobble*); o pareamento entre códon e anticódon pode "oscilar" nesse local de pareamento específico de nucleotídeo-nucleotídeo. Por exemplo, os dois códons para arginina, AGA e AGG, podem se ligar ao mesmo anticódon tendo uma uracila na sua extremidade 5′ (UCU). Do mesmo modo, três códons para glicina – GGU, GGC e GGA – podem formar um par de bases a partir do anticódon 3′ CCI 5′ (p. ex., I pode se parear com a base com U, C ou A). I é um nucleotídeo purina inosina gerado pela desaminação da adenina (ver Figura 32–2 para a estrutura), outra das bases peculiares que frequentemente aparecem na molécula de tRNA.

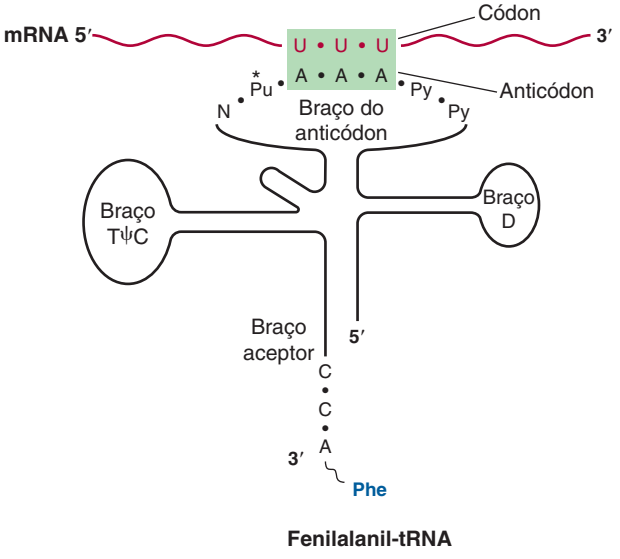


FIGURA 37-2 Reconhecimento do códon pelo anticódon. Um dos códons da fenilalanina é UUU. O tRNA carregado com fenilalanina (Phe) tem a sequência complementar AAA; portanto, ele forma um complexo de pares de bases com o códon. A região anticódon geralmente consiste em uma sequência de sete nucleotídeos: variável (N), purina modificada (Pu*), X, Y, Z(neste caso, AAA) e duas pirimidinas (Py) na direção 3′-5′.

OCORREM MUTAÇÕES QUANDO SÃO FEITAS ALTERAÇÕES NA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS

Embora a alteração inicial possa não ocorrer na fita-molde na molécula de DNA de fita dupla para esse gene, após a replicação, as moléculas de DNA filhas com mutações na fita-molde irão se separar e aparecer na população de organismos.

Algumas mutações ocorrem por substituição de bases

Mudanças de uma única base (**mutações pontuais**) podem ser **transições** ou **transversões**. No primeiro caso, uma determinada pirimidina é trocada por outra pirimidina ou uma certa purina é trocada por outra purina. As transversões são trocas de uma purina por qualquer uma das duas pirimidinas ou a troca de uma pirimidina por qualquer uma das duas purinas, como mostrado na **Figura 37-3**.

Se a sequência de nucleotídeo do gene que contém a mutação é transcrita em uma molécula de RNA, então essa molécula irá, certamente, possuir a base trocada na posição correspondente.

As trocas de uma única base nas moléculas de mRNA podem ocasionar vários efeitos quando traduzidas em proteínas:

1. Os efeitos podem ser não detectáveis devido à degenerescência do código; tais mutações são frequentemente chamadas de **mutações silenciosas**. Isso seria mais provável se a base trocada na molécula de mRNA fosse o terceiro nucleotídeo de um códon. Devido à oscilação, a tradução de um códon é menos sensível a uma mudança na terceira posição.
2. Um **efeito de troca** (***missense***) ocorre quando um aminoácido diferente é incorporado no local correspondente na molécula de proteína. Esse aminoácido trocado – ou *missense*, dependendo de sua localização na proteína específica – pode ser aceitável, parcialmente aceitável ou inaceitável para a função dessa molécula de proteína. A partir de um exame

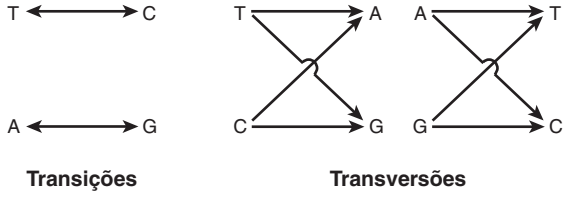


FIGURA 37-3 Representação diagramática de mutações de transição e transversão.

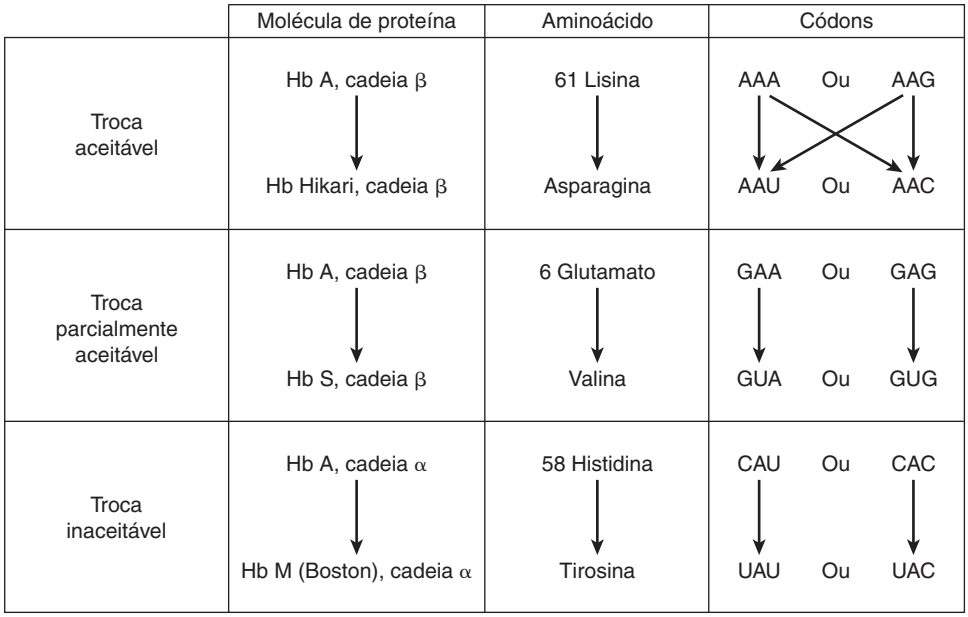


FIGURA 37-4 Exemplos de três tipos de mutações de troca resultando em cadeias de hemoglobina anormais. As alterações de aminoácidos e possíveis alterações nos respectivos códons são indicadas. A mutação da cadeia β da hemoglobina Hikari apresenta propriedades fisiológicas aparentemente normais, mas é eletroforeticamente alterada. A hemoglobina S tem uma mutação na cadeia β e funcionamento parcial; a hemoglobina S se liga ao oxigênio, mas precipita quando desoxigenada; isto faz as hemácias assumirem a forma de foice e representa a base celular e molecular da doença anemia falciforme (ver Figura 6–12). A hemoglobina M Boston, uma mutação da cadeia α, permite a oxidação do radical heme ferroso ao estado férrico e, assim, não se ligará ao oxigênio de maneira nenhuma.

cuidadoso do código genético, pode-se concluir que a maioria das trocas de uma única base resultaria na substituição de um aminoácido por outro de grupos funcionais bastante semelhantes. Este é um mecanismo eficaz para evitar mudanças drásticas nas propriedades físicas de uma molécula de proteína. Se um efeito de troca (*missense*) aceitável ocorre, a molécula de proteína resultante pode não ser distinguível da molécula normal. Um *missense* parcialmente aceitável irá resultar em uma molécula com uma função parcial, porém anormal. Se um efeito *missense* inaceitável ocorre, a molécula de proteína não será capaz de funcionar normalmente.

3. Um códon **sem sentido** (*nonsense*) pode aparecer, o que resultaria em um **término prematuro** da incorporação de aminoácidos a uma cadeia peptídica e na produção de apenas um fragmento da molécula de proteína prevista. É alta a probabilidade de que uma molécula de proteína ou um fragmento peptídico terminados prematuramente não irão funcionar em seu papel prescrito. Exemplos de diferentes tipos de mutações, e seus efeitos na codificação potencial do mRNA são mostrados nas **Figuras 37-4** e **37-5**.

Mutações *frameshift* (da fase de leitura) resultam da deleção ou inserção de nucleotídeos no DNA gerando mRNA modificados

A deleção de um único nucleotídeo a partir de uma fita codificadora de um gene resulta em um quadro de leitura modificado no mRNA. A maquinaria de tradução de mRNA não reconhece a falta da base, uma vez que não há pontuação na leitura dos códons. Assim, ocorre uma alteração importante na sequência de polimerização de aminoácidos, como mostrado no exemplo 1 na Figura 37-5. A mudança na fase de leitura resulta em uma tradução alterada do mRNA posterior à deleção de um único nucleotídeo. Não apenas a sequência de aminoácidos distal a essa deleção é alterada, mas a leitura da mensagem também pode resultar na aparência de um códon sem sentido (*nonsense*) e, portanto, na produção de um polipeptídeo tanto alterado quanto terminado prematuramente (exemplo 3, Figura 37-5).

Se os três nucleotídeos ou um múltiplo de três são excluídos de uma região codificadora, o mRNA correspondente, quando traduzido, irá fornecer uma proteína em que estará faltando o número correspondente de aminoácidos (exemplo 2, Figura 37-5). Como o quadro de leitura é uma trinca, a fase de leitura não será perturbada para aqueles códons posteriores à deleção. Se, no entanto, a deleção de um ou dois nucleotídeos ocorrer imediatamente antes ou no interior de um códon de terminação normal (códon sem sentido), a leitura do sinal de terminação normal é alterada. Tal deleção pode resultar em uma leitura além do sinal de terminação agora "mutante", até que outro códon sem sentido (*nonsense*) seja encontrado (exemplo 1, Figura 37-5).

Inserções em um gene de um, dois ou de um número de nucleotídeos não múltiplo de três resulta em um mRNA em que o quadro de leitura é distorcido na tradução, e os mesmos efeitos que ocorrem com as deleções se refletem na tradução do mRNA. Isto pode resultar em sequências alteradas de aminoácidos posteriormente à inserção e na geração de um **códon sem sentido** (***nonsense***) na inserção ou posteriormente a ela, ou talvez na leitura além do códon de terminação normal. Após a deleção em

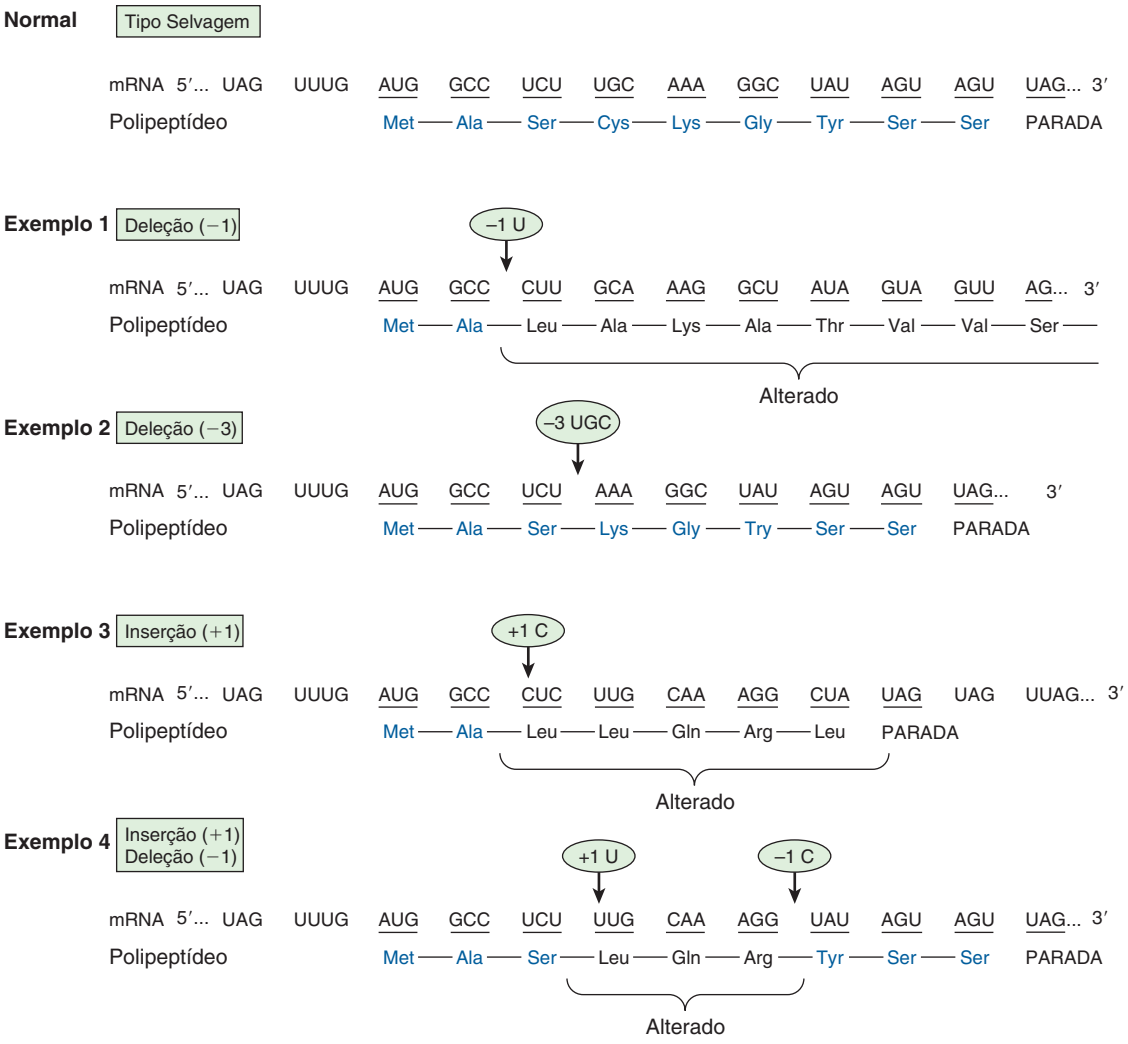


FIGURA 37-5 Exemplos dos efeitos de deleções e inserções em um gene na sequência do transcrito de mRNA e da cadeia de polipeptídeo traduzida a partir daí. As setas indicam os sítios de deleções ou inserções e os números nos ovais indicam o número de resíduos de nucleotídeos removidos ou inseridos. Letras coloridas indicam aminoácidos na ordem correta.

um gene, uma inserção (ou vice-versa) pode restabelecer o quadro de leitura adequado (exemplo 4, Figura 37-5). O mRNA correspondente, quando traduzido, poderia conter uma sequência de aminoácidos alterada entre a inserção e a deleção. Além do restabelecimento do quadro de leitura, a sequência de aminoácidos seria correta. Pode-se imaginar que diferentes combinações de deleções, inserções ou ambas resultariam na formação de uma proteína em que um trecho é anormal, mas que é cercado pelas sequências normais de aminoácidos. Tais fenômenos foram demonstrados convincentemente em várias doenças humanas.

Mutações supressoras podem neutralizar alguns dos efeitos de mutações de troca (*missense*), sem sentido (*nonsense*) e da fase de leitura (*frameshift*)

A discussão anterior dos produtos de proteínas alteradas de mutações de genes é baseada na presença de moléculas de tRNA que funcionam normalmente. Entretanto, em organismos procarióticos e em eucarióticos inferiores, foram descobertas moléculas de tRNA que funcionam anormalmente, sendo o resultado de mutações. Algumas destas moléculas de tRNA anormais são capazes de se ligar e decodificar códons alterados e, deste modo, suprimir os efeitos de mutações em genes estruturais mutantes distintos codificadores de mRNA. Essas **moléculas de tRNA supressoras**, geralmente formadas como resultado de alterações em suas regiões de anticódons, são capazes de suprimir certas mutações *missense, nonsense* e *frameshift*. Entretanto, uma vez que as moléculas de tRNA supressoras não são capazes de distinguir entre um códon normal e um resultante de uma mutação de um gene, sua presença na célula microbiana geralmente resulta em menor viabilidade. Por exemplo, as moléculas de tRNA supressoras *nonsense* podem suprimir os sinais de terminação normal para permitir uma leitura além da terminação, quando isso não é desejável. As moléculas de tRNA supressoras *frameshift* podem ler um códon normal além do componente de um códon justaposto para fornecer um

frameshift, mesmo quando ele não é desejável. Moléculas de tRNA supressoras podem existir em células de mamíferos, uma vez que a leitura além do código de terminação tem sido observada em algumas ocasiões. No contexto laboratorial, tais tRNAs supressores, acoplados a variantes mutantes de aminoacil-tRNA sintetases, podem ser utilizados para incorporar aminoácidos não naturais em locais definidos no interior de genes alterados que carregam mutações *nonsense* modificadas. As proteínas marcadas resultantes podem ser utilizadas para ligações cruzadas (*cross-linking*) e estudos biofísicos *in vivo* e *in vitro*. Essas novas ferramentas auxiliam de forma significativa os biólogos interessados em estudar os mecanismos de uma ampla variedade de processos biológicos.

COMO A TRANSCRIÇÃO, A SÍNTESE DE PROTEÍNAS PODE SER DESCRITA EM TRÊS FASES: INICIAÇÃO, ALONGAMENTO E TERMINAÇÃO

As características estruturais gerais dos ribossomos e seus processos de autoformação são discutidos no Capítulo 34. Essas entidades particulares servem como a maquinaria em que a sequência de nucleotídeos do mRNA é traduzida na sequência de aminoácidos de uma proteína específica. A tradução do mRNA começa próximo ao seu terminal 5′ com a formação do terminal amino correspondente da molécula de proteína. A mensagem é lida na direção 5′–3′, concluindo com a formação do terminal carboxila da proteína. Mais uma vez, o conceito de **polaridade** se manifesta. Tal como descrito no Capítulo 36, a transcrição de um gene no mRNA correspondente, ou em seu precursor, forma primeiro o terminal 5′ da molécula de RNA. Em procariotos, isso permite o início da tradução do mRNA antes que a tradução do gene seja concluída. Em organismos eucarióticos, o processo de transcrição é nuclear; a tradução do mRNA ocorre no citoplasma. Isso impede a transcrição e a tradução simultâneas em organismos eucarióticos e torna possível o processamento necessário para gerar o mRNA maduro a partir do transcrito primário.

A Iniciação envolve vários complexos de proteína-RNA

A iniciação da síntese de proteínas requer que uma molécula de mRNA seja selecionada para a tradução por um ribossomo **(Figura 37-6)**. Uma vez que o mRNA se liga ao ribossomo, este encontra o quadro de leitura correto no mRNA e a tradução se inicia. Esse processo envolve o tRNA, o rRNA, o mRNA e pelo menos 10 fatores de iniciação de eucariotos (eIFs), alguns dos quais possuem múltiplas subunidades (três a oito). Estão envolvidos também GTP, ATP e aminoácidos. A iniciação pode ser dividida em quatro etapas: (1) dissociação do ribossomo em suas subunidades 40S e 60S; (2) ligação de um complexo ternário composto do iniciador metionil-tRNA (met-tRNA^{i}), GTP, e eIF-2 ao ribossomo 40S para formar o complexo de pré-iniciação 43S; (3) ligação do mRNA ao complexo de pré-iniciação 40S para formar o complexo de iniciação 48S; e (4) combinação do complexo de iniciação 48S com a subunidade ribossomal 60S para formar o complexo de iniciação 80S.

Dissociação ribossomal

Dois fatores de iniciação, eIF-3 e eIF-1A, se ligam à recém-dissociada subunidade ribossomal 40S. Isso retarda sua reassociação com a subunidade 60S e permite que outros fatores de iniciação da tradução se associem com a subunidade 40S.

Formação do complexo de pré-iniciação 43S

A primeira etapa desse processo envolve a ligação do GTP ao eIF-2. Este complexo binário se liga, a seguir, ao met-tRNA^{i}, um tRNA especificamente envolvido na ligação ao códon de iniciação AUG (há dois tRNA para metionina, um especifica a metionina para o códon iniciador, o outro, para metioninas internas; cada um possui uma sequência de nucleotídeos única; e ambos são aminoacilados pela mesma metionil-tRNA sintetase). Esse complexo ternário se liga à subunidade ribossomal 40S para formar o complexo de pré-iniciação 43S, que é estabilizado pela associação ao eIF-3 e eIF-1A.

O eIF-2 é um dos dois pontos de controle para o início da síntese proteica em células de eucariotos. O eIF-2 é composto por subunidades α, β e γ. O eIF-2α é fosforilado (na serina 51) por, pelo menos, quatro proteínas quinases diferentes (HCR, PKR, PERK e GCN2) ativadas quando uma célula está em estresse e quando o gasto de energia necessário para a síntese de proteínas for prejudicial. Tais condições incluem o jejum prolongado de glicose e aminoácidos, infecções virais, presença intracelular de grandes quantidades de proteínas deformadas, desidratação celular, hiperosmolaridade e choque térmico. A PKR é particularmente interessante nesse aspecto. Essa quinase é ativada por vírus e provoca um mecanismo de defesa no hospedeiro que diminui a síntese de proteínas, incluindo a síntese de proteínas virais, inibindo, dessa forma, a replicação viral. O eIF-2α fosforilado se liga fortemente a eIF-2B, proteína recicladora de GTP-GDP, inativando-a. Isso impede a formação do complexo de pré-iniciação 43S e bloqueia a síntese de proteínas.

Formação do complexo de iniciação 48S

Os terminais 5′ da maioria das moléculas de mRNA em células de eucariotos são cobertos por um "capuz", como descrito no Capítulo 36. Essa cobertura de trifosfato de 7-metilguanosina facilita a ligação do mRNA ao complexo de pré-iniciação 43S. O complexo de proteína ligado à cobertura, eIF-4F (4F), que consiste em eIF-4E (4E) e do complexo eIF–4G (4G) –eIF4A (4A), se liga ao capuz por meio da proteína 4E. Em seguida, o eIF-4B (4B) se liga e reduz a estrutura secundária complexa da extremidade 5′ do mRNA por meio das atividades de ATPases e de helicases dependentes de ATP. A associação do mRNA ao complexo de pré-iniciação 43S para formar o complexo de iniciação 48S requer a hidrólise do ATP. O eIF-3 é uma proteína essencial porque se liga, com alta afinidade, ao componente 4G de 4F, e conecta esse complexo à subunidade ribossomal 40S. Após a associação do complexo de pré-iniciação 43S ao capuz de mRNA e redução ("fusão") da estrutura secundária próxima da extremidade 5′ do mRNA, pela ação da helicase 4B e do ATP, o complexo transloca na direção 5′–3′ e examina o mRNA em busca de um códon de iniciação adequado. Geralmente esse é o AUG mais próximo da direção 5′, mas o códon de iniciação exato é determinado pelas chamadas **sequências de consenso de Kozak**, que envolvem o AUG:

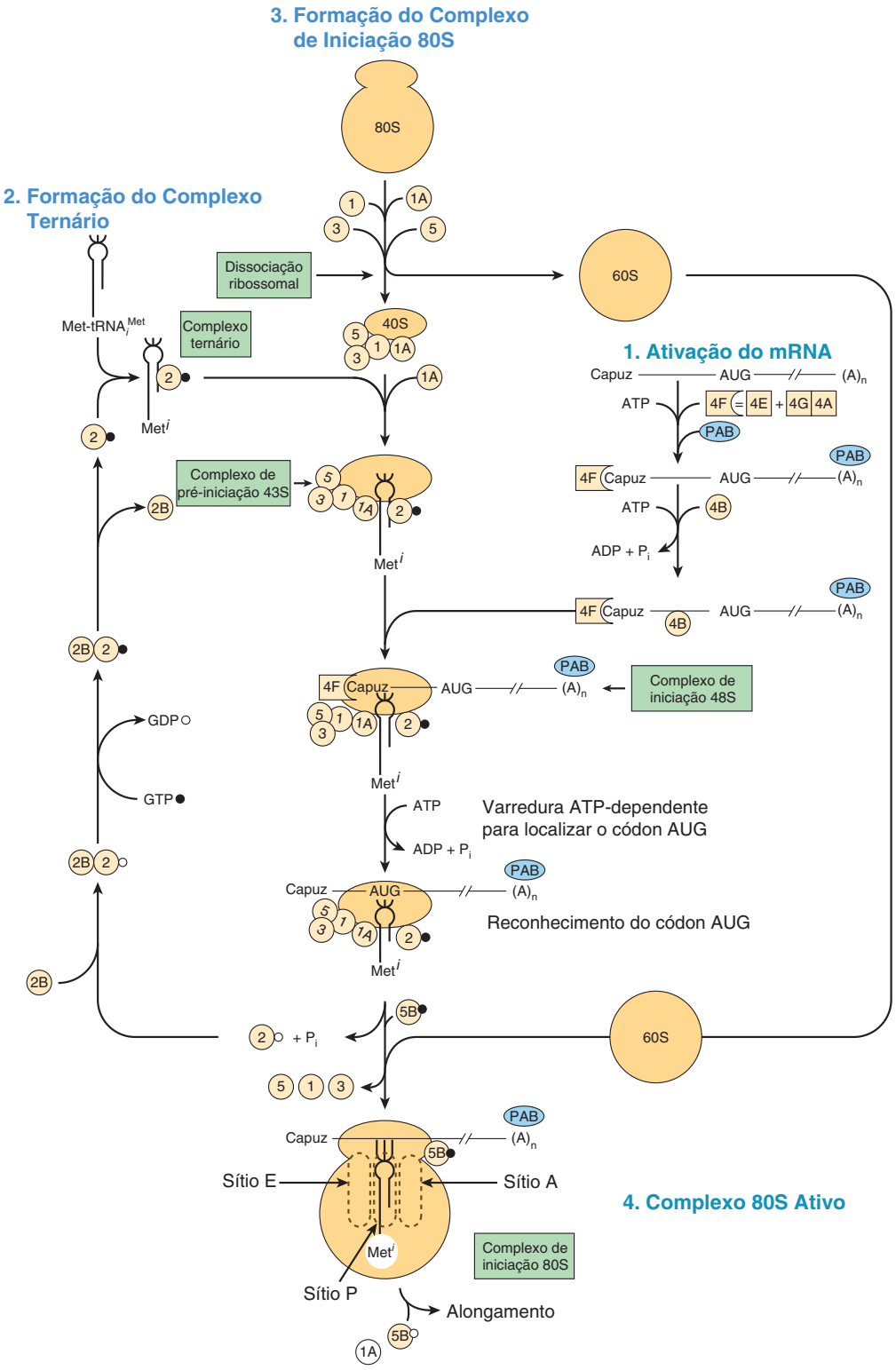
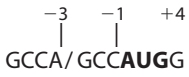


FIGURA 37-6 Representação diagramática da fase de iniciação da síntese proteica em um molde de mRNA de um eucarioto contendo um capuz 5′ e um terminal poli (A) 3′ [(A)$_n$]. Este processo se desenvolve em várias etapas: (1) ativação do mRNA (**direita**); (2) formação do complexo ternário consistindo em met-tRNA^i, fator de iniciação eIF-2 e GTP (**esquerda**); (3) varredura no complexo 43S para localizar o código de iniciação AUG, formando o complexo de iniciação 48S (**centro**); e (4) formação do complexo de iniciação ativo 80S (**embaixo, no centro**). (Mais detalhes no texto.) (GTP, •; GDP,°.) Os vários fatores de iniciação aparecem na forma abreviada como círculos ou quadrados, por exemplo, eIF-3, (③), eIF-4F, (4F), (4F). 4 • F é um complexo consistindo em 4E e 4A ligados a 4G (ver Figura 37-7). A proteína de ligação poli A, que interage com a cauda poli-A 3′ do mRNA, é abreviada como PAB. A constelação de fatores proteicos e a subunidade ribossomal 40S incluem o complexo pré-iniciação 43S. Quando ligado ao mRNA, isso forma o complexo de pré-iniciação 48S.



A presença de uma purina nas posições –3 e +4, em relação ao AUG, é a mais preferida.

Função da cauda de poli(A) na iniciação

Experimentos bioquímicos e genéticos em leveduras revelaram que a cauda de poli(A) 3′ e sua proteína de ligação, PAB1, são necessárias para o início eficiente da síntese de proteínas. Estudos adicionais mostraram que a cauda de poli(A) estimula o recrutamento da subunidade ribossomal 40S para o mRNA por meio de um conjunto complexo de interações. A PAB1 **(Figura 37-7)**, ligado à cauda de poli(A), interage com o eIF-4G e a subunidade 4E do eIF-4F que é ligada ao capuz. Uma estrutura circular é formada e auxilia a direcionar a subunidade ribossomal 40S para a extremidade 5′ do mRNA e provavelmente também estabiliza os mRNAs, impedindo sua degradação exonucleolítica. Isto ajuda a explicar como as estruturas do capuz e da cauda de poli(A) possuem um efeito sinérgico na síntese de proteínas. De fato, as interações diferenciais proteína-proteína entre os repressores gerais e específicos da tradução de mRNA e o eIF-4E resultam no controle de tradução dependente de capuz m^7G **(Figura 37-8)**.

Formação do complexo de iniciação 80S

A ligação da subunidade ribossomal 60S ao complexo de iniciação 48S envolve a hidrólise do GTP ligado ao eIF-2 por eIF-5. Essa reação resulta na liberação dos fatores de iniciação ligados ao complexo de iniciação 48S (esses fatores, então, são reciclados) e na rápida associação das subunidades 40S e 60S para formar o ribossomo 80S. Neste ponto, o met-$tRNA^i$ está no sítio P do ribossomo, pronto para o início do ciclo de alongamento.

A regulação do eIF-4E controla a taxa de iniciação

O complexo 4F é particularmente importante no controle da taxa de tradução de proteínas. Como descrito anteriormente, o 4F é

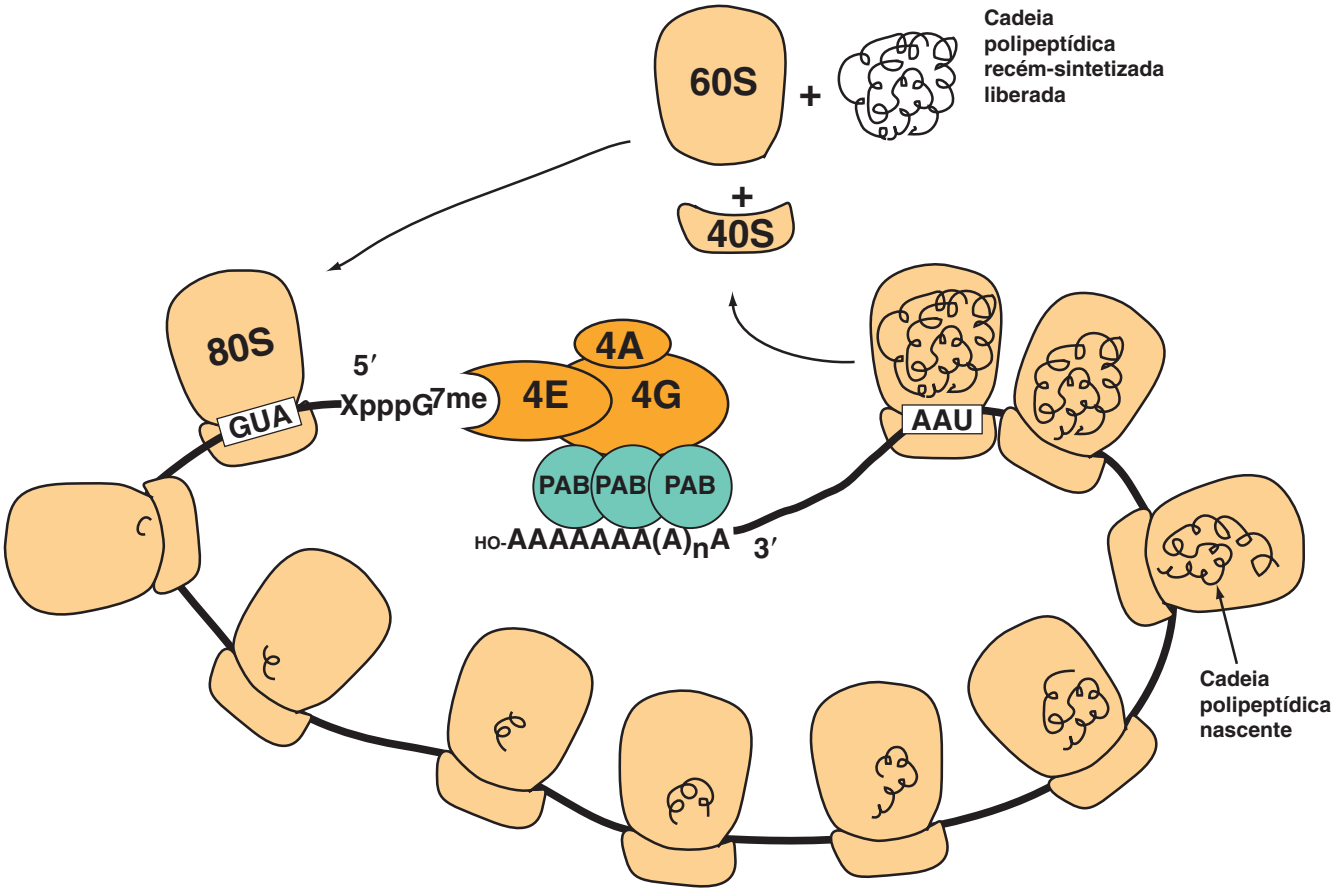


FIGURA 37-7 Ilustração esquemática da circularização do mRNA por meio das interações proteína-proteína entre o eIF4F ligado ao m^7G e a proteína de ligação ligada à cauda poli A. O eIF4F, composto pelas subunidades eIF4A, 4E e 4G se liga ao capuz 5′-m7G do mRNA (-$XpppG^{7me}$), acima do códon de início da tradução (AUG) com alta afinidade. A subunidade IF4G do complexo também se liga à proteína de ligação poli A (PAB) com alta afinidade. Como a PAB se liga fortemente à cauda poli A 3′ do mRNA (OH-$AAAAAAA(A)_nA$), ocorre circularização. São mostrados múltiplos ribossomos 80S que se encontram no processo de traduzir o mRNA circularizado em proteína (espirais pretos), formando um polissomo. Ao encontrar um códon de término (UAA), ocorre a terminação da tradução, levando à liberação e dissociação do ribossomo 80S nas subunidades 60S e 40S e em proteínas recém-traduzidas. As subunidades ribossomais dissociadas podem ser recicladas por outro ciclo de tradução (ver Figura 37-6).

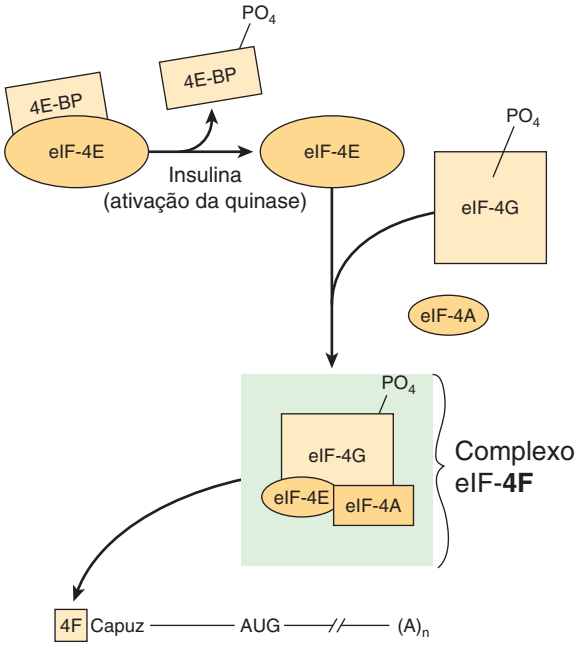


FIGURA 37-8 Ativação do eIF-4E pela insulina e formação do complexo eIF-4F de ligação ao capuz. O complexo de cobertura 4F do mRNA é mostrado nas Figuras 37-6 e 37-7. O complexo 4F consiste em eIF-4E (4E), eIF-4A e eIF-4G. O 4E é inativo quando ligado a uma de uma família de proteínas de ligação (4EBP). A insulina e os fatores mitogênicos (p. ex., IGF-1, PDGF, interleucina-2 e angiotensina II) ativam as vias PI3 quinase/AKT quinase, que ativam a mTOR quinase, resultando na fosforilação do 4E-BP (ver Figura 42–8). O 4E-BP fosforilado se dissocia de 4E, e o último é então capaz de formar o complexo 4F e se ligar à cobertura do mRNA. Esses polipeptídeos de crescimento também induzem a fosforilação do próprio 4G pelas vias mTOR e MAP quinase. O 4F fosforilado se liga muito mais avidamente do capuz do que o 4F não fosforilado.

um complexo composto por 4E, que se liga à estrutura do capuz m^7G na extremidade 5′ do mRNA, e 4G, que funciona como uma proteína de arcabouço. Além da ligação ao 4E, o 4G se liga ao eIF-3, que liga o complexo à subunidade ribossomal 40S. Ele também se liga a 4A e 4B, o complexo ATPase-helicase que auxilia no desenrolamento do RNA (Figura 37-8).

O 4E é responsável pelo reconhecimento da estrutura do capuz do mRNA, uma etapa limitante de velocidade da tradução. Esse processo é regulado adicionalmente pela fosforilação. A insulina e os fatores de crescimento mitogênicos resultam na fosforilação de 4E em ser 209 (ou thr 210). O 4E fosforilado se liga ao capuz muito mais avidamente do que a forma não fosforilada, intensificando, assim, a taxa de iniciação. Os componentes da MAP quinase e vias das quinases PI3K, mTOR, RAS e S6 (ver Figura 42–8) parecem estar envolvidos nessas reações de fosforilação.

A atividade de 4E é regulada de uma segunda maneira, e isso também envolve a fosforilação. Recentemente, foi descoberto um conjunto de proteínas que se ligam a um 4E, inativando-o. Essas proteínas incluem 4EBP1 (BP1, também conhecida como PHAS-1) e suas proteínas estreitamente relacionadas 4E-BP2 e 4E-BP3. A BP1 se liga com alta afinidade à 4E. A associação [4E]•[BP1] impede que 4E se ligue ao 4G (para formar 4F). Uma vez que essa interação é essencial para a ligação do 4F à subunidade ribossomal 40S e para seu posicionamento correto no mRNA com capuz, o BP-1 inibe efetivamente a iniciação da tradução.

A insulina e os fatores de crescimento resultam na fosforilação do BP-1 em sete sítios exclusivos. A fosforilação do BP-1 resulta em sua dissociação a partir do 4E, e ele não pode se religar até que sítios críticos sejam desfosforilados. Esses efeitos na ativação de 4E explicam, em parte, como a insulina provoca um aumento pós-transcricional acentuado da síntese de proteínas no fígado e nos tecidos adiposo e muscular.

O alongamento também é um processo de múltiplas etapas facilitado por fatores acessórios

O alongamento é um processo cíclico no ribossomo, no qual um aminoácido de cada vez é adicionado à cadeia nascente de peptídeos **(Figura 37-9)**. A sequência de peptídeos é determinada pela ordem de códons no mRNA. O alongamento envolve várias etapas catalisadas por proteínas chamadas de fatores de alongamento (EFs). Essas etapas são (1) ligação do aminoacil-tRNA ao sítio A, (2) formação da ligação peptídica, (3) translocação do ribossomo no mRNA e (4) expulsão do tRNA desacilado dos sítios P e E.

Ligação do aminoacil-tRNA ao sítio A

No ribossomo 80S completo formado durante o processo de iniciação, ambos os sítios A (sítio aminoacil ou aceptor) e E (sítio de saída do tRNA desacilado) estão livres. A ligação do aminoacil-tRNA adequado ao sítio A requer o reconhecimento do códon correto. O **fator de alongamento 1A** (**EF1A**) forma um complexo ternário com o GTP e o aminoacil-tRNA que está entrando (Figura 37-9). Esse complexo então permite que o aminoacil-tRNA correto entre no sítio A com a liberação de EF1A•GDP e fosfato. A hidrólise do GTP é catalisada por um sítio ativo no ribossomo; a hidrólise induz uma mudança conformacional no ribossomo, aumentando concomitantemente a afinidade pelo tRNA. Como mostrado na Figura 37-9, o EF1A-GDP então se recicla para EF1A-GTP com o auxílio de outros fatores proteicos solúveis e GTP.

Formação da ligação peptídica

O grupo α amino do novo aminoacil-tRNA, no sítio A, realiza um ataque nucleofílico ao grupo carboxila esterificado do peptidil-tRNA que ocupa o sítio P (sítio peptidil ou polipeptídeo). Na iniciação, esse sítio é ocupado pelo met-$tRNA^i$ iniciador. Essa reação é catalisada por uma **peptidiltransferase**, um componente do RNA 28S da subunidade ribossomal 60S. Este é outro exemplo de atividade de ribozima e indica um importante – e previamente ignorado – papel direto do RNA na síntese de proteínas (**Tabela 37-3**). Como o aminoácido no aminoacil-tRNA já está "ativado", nenhuma fonte de energia adicional é necessária para essa reação. A reação resulta na ligação da cadeia de peptídeo em crescimento ao tRNA no sítio A.

Translocação

O agora desacilado tRNA se liga ao seu anticódon no sítio P em uma extremidade e por uma cauda CCA aberta a um **sítio de**

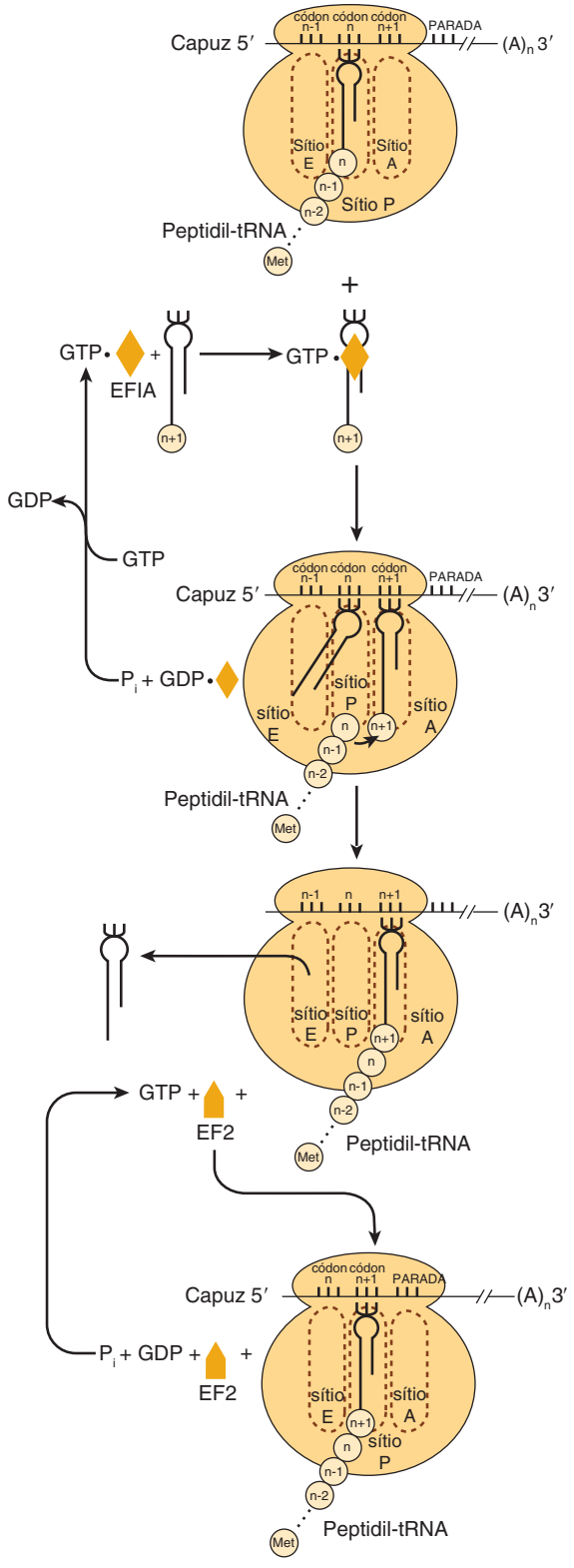


FIGURA 37-9 Representação diagramática do processo de alongamento do peptídeo da síntese proteica. Os círculos pequenos rotulados n – 1, n, n + 1, etc, representam os resíduos de aminoácidos da molécula de proteína recém-formada e os códons correspondentes no mRNA. EFIA e EF2 representam os fatores de alongamento 1 e 2, respectivamente. Os sítios do peptidil-tRNA, aminoacil-tRNA e de Saída no ribossomo são representados pelos sítios P, A e E, respectivamente.

TABELA 37-3 Evidências de que o rRNA é uma peptidiltransferase

• Os ribossomos podem fazer ligações peptídicas mesmo quando as proteínas são removidas ou inativadas
• Certas partes da sequência de rRNA são altamente conservadas em todas as espécies
• Essas regiões conservadas estão na superfície da molécula de RNA
• O RNA pode ser catalítico
• Mutações que resultam em resistência a antibióticos no nível da síntese proteica são mais frequentemente encontradas no rRNA do que nos componentes proteicos do ribossomo.
• A estrutura cristalina vista por raios X da subunidade maior ligada ao tRNA sugere mecanismo detalhado.

saída (**E**) na grande subunidade ribossomal (parte central da Figura 37-9). Neste ponto, o **fator de alongamento 2** (**EF2**) se liga ao peptidil-tRNA e o desloca do sítio A para o sítio P. Por sua vez, o tRNA desacilado está no sítio E, de onde ele deixa o ribossomo. O complexo EF2-GTP é hidrolisado à EF2-GDP, movendo efetivamente o mRNA para frente por um códon e deixando sítio A aberto para ser ocupado por outro complexo ternário de aminoácidos tRNA-EF1AGTP e outro ciclo de alongamento.

O carregamento da molécula de tRNA com o radical aminoacil requer a hidrólise de um ATP em AMP, equivalente à hidrólise de dois ATP a dois ADPs e fosfatos. A entrada do aminoacil-tRNA no sítio A resulta na hidrólise de um GTP em GDP. A translocação do recém-formado peptidil-tRNA do sítio A para o sítio P pelo EF2 resulta, do mesmo modo, na hidrólise de GTP em GDP e fosfato. Assim, as necessidades energéticas para a formação de uma ligação peptídica incluem o equivalente à hidrólise de duas moléculas de ATP em ADP e de duas moléculas de GTP em GDP, ou a hidrólise de quatro ligações de fosfato de alta energia. Os ribossomos de eucariotos podem incorporar até seis aminoácidos por segundo, enquanto os de procariotos incorporam até 18 por segundo. Assim, o processo de síntese peptídica, que precisa de energia, ocorre com grande velocidade e precisão até que um códon de terminação seja alcançado.

A terminação ocorre quando um códon de parada é reconhecido

Comparado à iniciação e ao alongamento, o término ou a terminação é um processo relativamente simples (**Figura 37-10**). Após múltiplos ciclos de alongamento que culminam na polimerização de aminoácidos específicos em uma molécula de proteína, o códon de parada ou terminação de mRNA (UAA, UAG, UGA) aparece no sítio A. Normalmente, não há tRNA com um anticódon capaz de reconhecer tal sinal de terminação. O **fator de liberação RF1** reconhece que um códon de parada está no sítio A (Figura 37-10). O RF1 é ligado por um complexo composto pelo **fator de liberação RF3** com o GTP ligado. Este complexo, com a peptidiltransferase, promove a hidrólise da ligação entre o peptídeo e o tRNA que ocupa o sítio P. Assim,

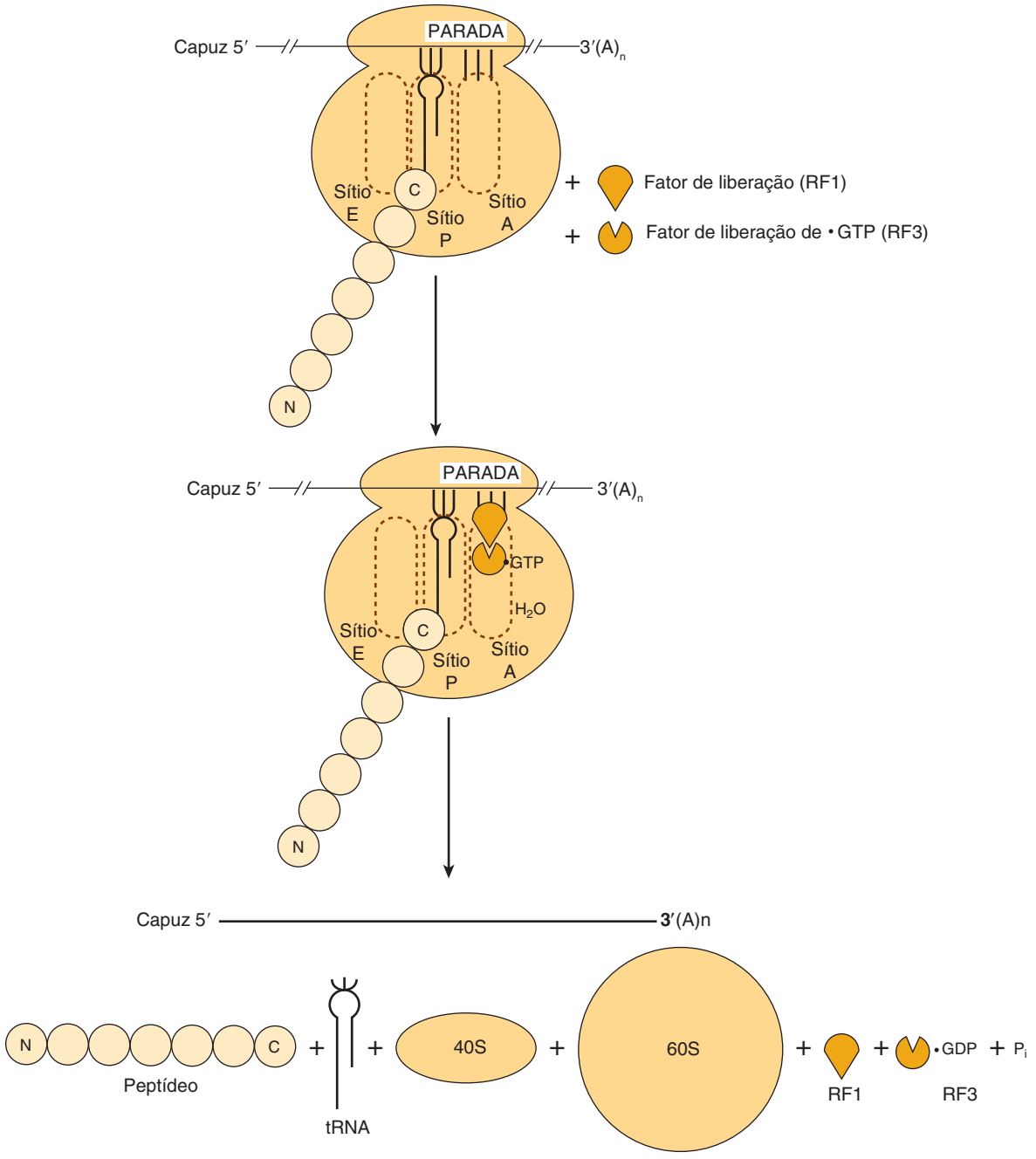


FIGURA 37-10 Representação diagramática do processo da terminação da síntese proteica. Os sítios de peptidil-tRNA, aminoacil-tRNA e de saída estão indicados como sítios P, A e E, respectivamente. O códon de terminação (parada) é indicado pelas três barras verticais e "parada". O fator de liberação RF1 se liga ao códon de parada. O fator de liberação RF3, com o GTP ligado, se liga ao RF1. A hidrólise do complexo peptidil--tRNA é mostrada pela entrada de H_2O. N e C indicam os terminais amino e carboxila dos aminoácidos da cadeia de polipeptídeos nascente, respectivamente, e ilustram a polaridade as síntese proteica.

uma molécula de água, em vez de um aminoácido, é adicionada. Essa hidrólise libera a proteína e o tRNA do sítio P. Após a hidrólise e liberação, o **ribossomo 80S se dissocia** em suas subunidades 40S e 60S, que são, então, recicladas (Figura 37-7). Portanto, os fatores de liberação são proteínas que hidrolisam a ligação peptidil-tRNA quando um códon de parada ocupa o sítio A. O mRNA é, então, liberado do ribossomo, que se dissocia em suas subunidades componentes 40S e 60S, e outro ciclo pode ser repetido.

Os polissomos são conjuntos de ribossomos

Muitos ribossomos podem traduzir a mesma molécula de mRNA simultaneamente. Devido ao seu tamanho relativamente grande,

as partículas ribossomais não podem se ligar a um mRNA mais perto do que 35 nucleotídeos de distância. Múltiplos ribossomos na mesma molécula de mRNA formam um **polirribossomo**, ou "polissomo" (Figura 37-7). Em um sistema sem restrição, o número de ribossomos ligados a um mRNA (e, portanto, o tamanho dos polirribossomos) se correlaciona positivamente ao comprimento da molécula de mRNA.

Os polirribossomos que sintetizam ativamente proteínas podem existir como partículas livres no citoplasma celular ou podem estar ligados a lâminas de material citoplasmático membranoso chamado de **retículo endoplasmático**. A ligação dos polirribossomos particulados ao retículo endoplasmático é responsável por sua aparência "rugosa", como observado na microscopia eletrônica. As proteínas sintetizadas pelos polirribossomos ligados são extrusas para o espaço da cisterna entre as lâminas de retículo endoplasmático rugoso, e daí elas são exportadas. Alguns dos produtos de proteínas do retículo endoplasmático rugoso são acondicionados pelo aparelho de Golgi para eventual exportação (ver Capítulo 46). As partículas de polirribossomos livres no citosol são responsáveis pela síntese de proteínas necessárias para as funções intracelulares.

Os mRNAs não traduzidos podem formar partículas de ribonucleoproteínas que se acumulam em organelas citoplasmáticas denominadas corpos P

Os mRNAs, ligados por proteínas compactadoras específicas e exportados do núcleo como partículas de ribonucleoproteínas (RNP), algumas vezes não se associam imediatamente aos ribossomos para serem traduzidos. Em vez disso, os mRNAs específicos podem se associar aos componentes proteicos que formam os corpos P, compartimentos densos pequenos que incorporam os mRNAs, como mRNP **(Figura 37-11)**. Essas organelas citoplasmáticas estão relacionadas a pequenos grânulos que contêm mRNAs semelhantes, encontrados em neurônios e em certas células maternas. Os corpos P são sítios de repressão da tradução e de destruição do mRNA. Mais de 35 proteínas diferentes foram apontadas como residindo exclusivamente ou principalmente no interior dos corpos P. Essas proteínas variam desde enzimas de *retirada do capuz* do mRNA, RNA-helicases e RNA-exonucleases (5′–3′ e 3′–5′) até componentes envolvidos na funcionamento do miRNA e no controle de qualidade do mRNA. Entretanto, a incor-

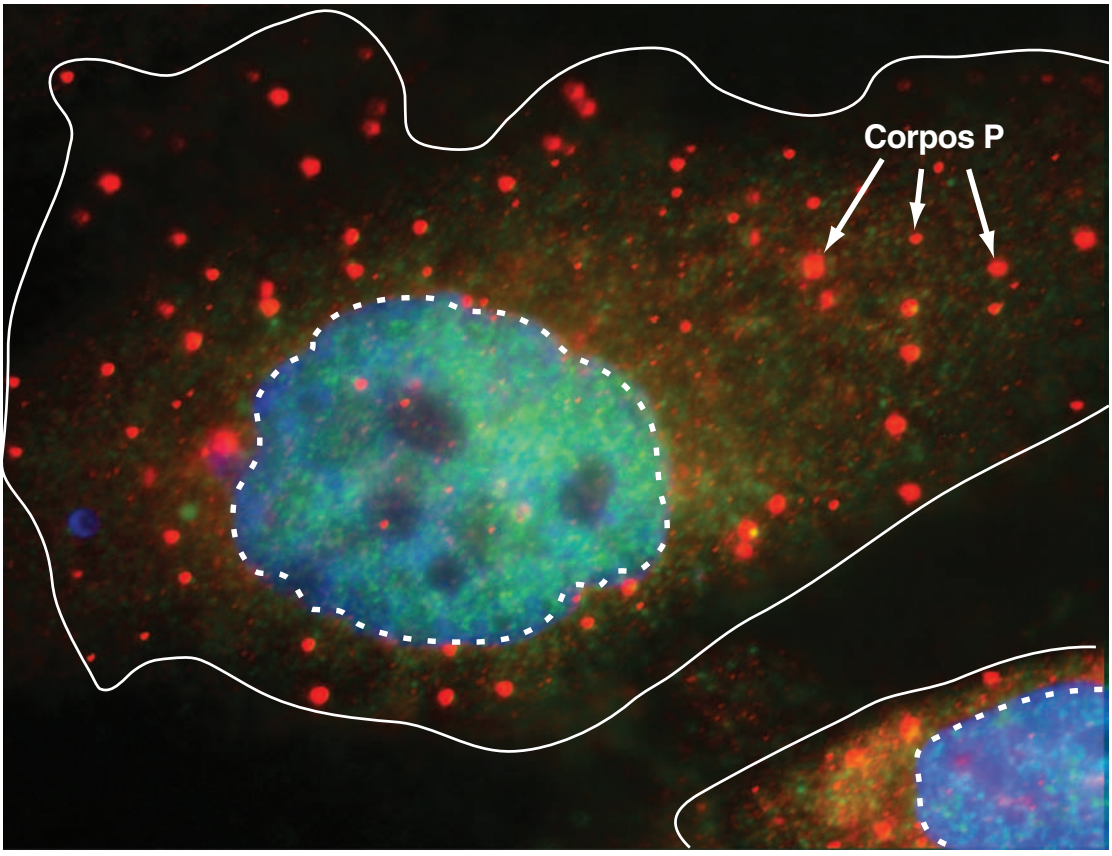


FIGURA 37-11 O corpo P é uma organela citoplasmática que modula o metabolismo do mRNA. Fotomicrografia de duas células de mamíferos em que uma única proteína distinta constituinte do corpo P foi visualizada usando o anticorpo cognato marcado fluorescentemente. Os corpos P aparecem como círculos claros de tamanho variável ao longo do citoplasma. As membranas celulares são indicadas por uma linha branca contínua e os núcleos por uma linha tracejada. Os núcleos foram corados por contraste usando um corante fluorescente com espectros de excitação/emissão de fluorescência diferentes do anticorpo marcado usado para identificar os corpos P; o corante nuclear se intercala entre os pares de bases de DNA. (Utilizada com a permissão do Dr. Roy Parker.)

poração de um mRNP não é uma inequívoca "sentença de morte" do mRNA. De fato, embora os mecanismos não sejam totalmente compreendidos, certos mRNAs parecem ser temporariamente armazenados nos corpos P e, então, recuperados e utilizados na tradução de proteínas. Isto sugere que há um equilíbrio no qual as funções citoplasmáticas do mRNA (tradução e degradação) são controladas por interações dinâmicas do mRNA com os polissomos e os corpos P.

A maquinaria da síntese de proteínas pode responder a ameaças ambientais

A **ferritina**, uma proteína ligadora de ferro, evita que o ferro ionizado (Fe^{2+}) atinja níveis tóxicos no interior das células. O ferro elementar estimula a síntese de ferritina, provocando a liberação de uma proteína citoplasmática que se liga a uma região específica na região 5′ não traduzida do mRNA da ferritina. O rompimento dessa interação proteína-mRNA ativa o mRNA da ferritina e resulta em sua tradução. Esse mecanismo fornece um controle rápido da síntese de uma proteína que sequestra o Fe^{2+}, uma molécula potencialmente tóxica. Do mesmo modo, o estresse ambiental e a inanição inibem as funções positivas do mTOR (Figura 37-8; Figura 42–8) na promoção da ativação do eIF4F e da formação do complexo 48S.

Muitos vírus cooptam pela maquinaria da síntese de proteínas da célula do hospedeiro

A maquinaria da síntese de proteínas também pode ser modificado de modo prejudicial. **Os vírus replicam utilizando os processos das células hospedeiras**, incluindo aqueles envolvidos na síntese de proteínas. Alguns mRNAs virais são traduzidos de maneira bem mais eficiente do que aqueles das células do hospedeiro (p. ex., vírus da encefalomiocardite). Outros, como os reovírus e o vírus da estomatite vesicular, replicam de maneira eficiente e, assim, os seus mRNAs muito abundantes possuem uma vantagem competitiva sobre os mRNAs das células do hospedeiro para fatores de tradução limitados. Outros vírus inibem a síntese proteica da célula do hospedeiro ao impedirem a associação do mRNA com o ribossomo 40S.

O vírus da pólio e outros picornavírus ganham uma vantagem seletiva interrompendo a função do complexo 4F. Os mRNAs desses vírus não possuem uma estrutura de capuz para direcionar a ligação da subunidade ribossomal 40S (ver anteriormente). Em vez disso, a subunidade ribossomal 40S entra em contato com um **sítio de entrada ribossomal interno** (**IRES**) em uma reação que requer o 4G, mas não o 4E. O vírus ganha uma vantagem seletiva pela posse de uma protease que ataca o 4G e remove o sítio de ligação do terminal amina do 4E. Agora, o complexo 4E-4G (4F) não pode se formar e, assim, a subunidade ribossomal 40S não pode ser direcionada para cobrir os mRNAs. A tradução da célula do hospedeiro é, portanto, abolida. O fragmento 4G pode direcionar a ligação da subunidade ribossomal 40S para os mRNAs que contêm IRES de modo que a tradução do mRNA viral é muito eficaz (**Figura 37-12**). Esses vírus também promovem a desfosforilação de BP1 (PHAS-1) e, assim, diminuem a tradução dependente de capuz (4E) (Figura 37-8).

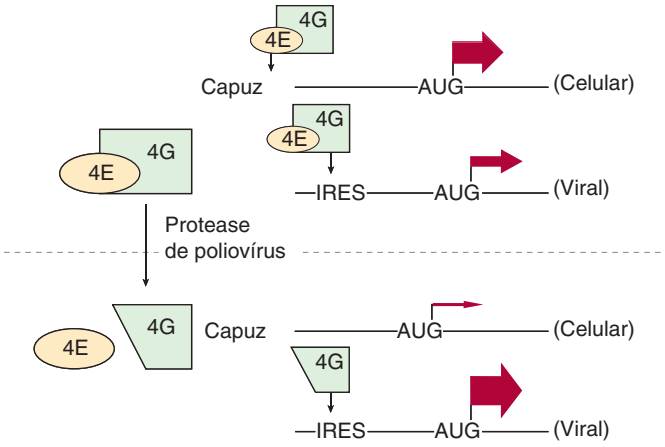


FIGURA 37-12 Picornavírus desfazem o complexo 4F. O complexo 4E-4G (4F) dirige a subunidade ribossomal 40S para o mRNA geralmente com capuz (*capped*, ver texto). Apenas o 4G é suficiente para direcionar a subunidade 40S para o sítio de entrada ribossomal interno (IRES) dos mRNA virais. Para ganhar vantagem seletiva, certos vírus (p. ex., poliovírus) expressam uma protease que cliva o sítio de ligação 4E da extremidade terminal amino do 4G. Este 4G truncado dirige a subunidade ribossomal 40S para os mRNA que têm um IRES mas não para aqueles que têm um capuz. As larguras das setas indicam a taxa de início da tradução a partir do códon AUG em cada exemplo. Outros vírus utilizam processos diferentes para realizar início seletivo da tradução dos seus mRNAs virais cognatos por meio de elementos IRES.

O PROCESSAMENTO PÓS-TRADUÇÃO AFETA A ATIVIDADE DE MUITAS PROTEÍNAS

Alguns vírus de animais, principalmente o HIV, o poliovírus e o vírus da hepatite A sintetizam proteínas policistrônicas longas a partir de uma molécula de mRNA longa. As moléculas de proteínas traduzidas a partir desses mRNAs longos são subsequentemente clivadas em sítios específicos para fornecer as várias proteínas específicas necessárias para a função viral. Em células animais, muitas proteínas celulares são sintetizadas a partir do molde de mRNA como uma molécula precursora que, a seguir, deve ser modificada para chegar à proteína ativa. O protótipo é a insulina, uma proteína pequena que possui duas cadeias polipeptídicas com pontes dissulfeto inter e intracadeias. A molécula é sintetizada como uma única cadeia precursora, ou **pró-hormônio**, que se dobra para permitir a formação das pontes dissulfeto. Uma protease específica remove então o segmento que conecta as duas cadeias, formando a molécula de insulina funcional (Figura 41–12).

Muitos outros peptídeos são sintetizados como pró-proteínas que necessitam de modificações antes de exercerem suas atividades biológicas. Muitas das modificações pós-tradução envolvem a remoção dos resíduos de aminoácidos aminoterminais por aminopeptidades específicas. O colágeno, uma proteína abundante nos espaços extracelulares de eucariotos superiores, é sintetizado como pró-colágeno. Três moléculas polipeptídicas de pró-colágeno, frequentemente com sequências não idênticas, se

alinham de um modo particular que é dependente da existência de peptídeos aminoterminais específicos (Figura 5–11). Enzimas específicas, então, realizam as hidroxilações e oxidações de resíduos de aminoácidos específicos no interior das moléculas de pró-colágeno, fornecendo as ligações cruzadas para maior estabilidade. Os peptídeos aminoterminais são clivados para fora da molécula para formar o produto final – uma molécula de colágeno forte e insolúvel. Ocorrem muitas outras modificações pós-tradução de proteínas. Modificações covalentes por acetilação, fosforilação, metilação, ubiquitinação e glicosilação são comuns, por exemplo (i.e., Capítulo 5, Tabela 35–1).

MUITOS ANTIBIÓTICOS FUNCIONAM INIBINDO SELETIVAMENTE A SÍNTESE PROTEICA DE BACTÉRIAS

Os ribossomos em bactérias e nas mitocôndrias de células de eucariotos superiores são diferentes dos ribossomos de mamíferos descritos no Capítulo 34. Os ribossomos bacterianos são menores (70S em vez de 80S) e possuem um complemento de RNA e moléculas de proteína um pouco mais simples. Esta diferença pode ser explorada para fins clínicos, pois muitos antibióticos eficazes interagem especificamente com as proteínas e os RNAs de ribossomos de procariotos e, assim, apenas inibem a síntese proteica bacteriana. Isso resulta em parada do crescimento ou morte da bactéria. Os membros mais eficientes dessa classe de antibióticos (p. ex., tetraciclinas, lincomicina, eritromicina e cloranfenicol) não interagem com os componentes de ribossomos de eucariotos e, assim, não são tóxicos para os eucariotos. A tetraciclina impede a ligação dos aminoacil-tRNAs ao ribossomo bacteriano no sítio A. O cloranfenicol e a classe dos antibióticos dos macrolídeos agem por meio da ligação ao rRNA 23S, o que é interessante diante do papel recentemente reconhecido do rRNA na formação da ligação peptídica pela atividade da sua peptidiltransferase. Deve ser mencionado que a semelhança estreita entre os ribossomos dos procariotos e mitocondriais pode levar a complicações na utilização de alguns antibióticos. Outros antibióticos inibem a síntese proteica em todos os ribossomos (**puromicina**) ou apenas em células de eucariotos (**cicloheximida**). A puromicina (**Figura 37-13**) é um análogo estrutural do tirosinil-tRNA. A puromicina é incorporada por meio do sítio A ao ribossomo na posição da carboxila terminal de um peptídeo, mas provoca a liberação prematura do polipeptídeo. A puromicina, como um análogo do tirosinil-tRNA, inibe efetivamente a síntese proteica tanto em procariotos quanto em eucariotos. A cicloheximida inibe a peptidiltransferase na subunidade ribossomal 60S em eucariotos, presumivelmente por ligação a um componente de rRNA.

A **toxina diftérica**, uma exotoxina do *Corynebacterium diphtheriae* infectado com um fago lisogênico específico, catalisa a ADP-ribosilação de EF-2 no aminoácido peculiar diftamida em células de mamíferos. Essa modificação inativa o EF-2 e, desse modo, inibe especificamente a síntese proteica em mamíferos. Vários animais (p. ex., camundongos) são resistentes à toxina diftérica. Esta resistência se deve à incapacidade da toxina diftérica em cruzar a membrana celular em vez de ser resultante de insensibilidade do EF-2 dos camundongos à ribosilação catalisada por ADP da toxina diftérica pelo NAD.

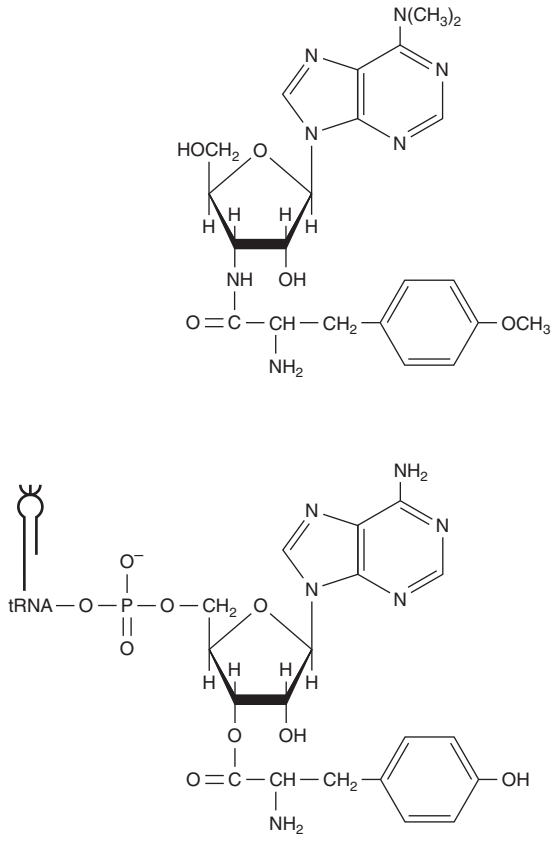


FIGURA 37-13 As estruturas comparativas do antibiótico puromicina (acima) e da porção terminal 3′ do tirosinil-tRNA (embaixo).

A ricina, uma molécula extremamente tóxica isolada da mamona, inativa o RNA ribossomal 28S de eucariotos por meio da clivagem N-glicolítica ou remoção de uma única adenina.

Muitos desses compostos – puromicina e cicloheximida em particular – não são clinicamente úteis, mas têm sido importantes na elucidação do papel da síntese proteica na regulação dos processos metabólicos, particularmente na indução enzimática por hormônios.

RESUMO

- O fluxo de informação genética obedece à sequência DNA → RNA → proteína.
- A informação genética na região estrutural de um gene é transcrita em uma molécula de RNA de modo que a sequência da última é complementar àquela de uma das fitas do DNA.
- O RNA ribossomal (rRNA), o RNA transportador (tRNA) e o RNA mensageiro (mRNA) estão diretamente envolvidos na síntese proteica.
- Os miRNAs regulam o funcionamento do mRNA no nível da tradução e/ou estabilidade.

- A informação no mRNA está em uma sequência ordenada de códons, cada um dos quais tem três nucleotídeos de comprimento.
- O mRNA é lido continuamente a partir de um códon de início (AUG) até um códon de término (UAA, UAG, UGA).
- O quadro de leitura aberto, ou ORF, do mRNA é a série de códons, cada um especificando um certo aminoácido, que determina a sequência de aminoácidos precisa da proteína.
- A síntese proteica, como a síntese de DNA e RNA, segue a polaridade 5′-3′ do mRNA e pode ser dividida em três processos: iniciação, alongamento e terminação.
- Proteínas mutantes surgem quando substituições de uma única base resultam em códons que especificam um aminoácido diferente em certa posição, quando um códon de parada resulta em uma proteína truncada, ou quando adições ou deleções de bases alteram a sequência de leitura, de modo que códons diferentes são lidos.
- Uma variedade de compostos, incluindo vários antibióticos, inibe a síntese proteica ao afetar uma ou mais etapas envolvidas na síntese de proteínas.

REFERÊNCIAS

Altmann M, Linder P: Power of yeast for analysis of eukaryotic translation initiation. J Biol Chem 2010;285:31907–13192.

Beckham CJ, Parker R: P bodies, stress granules, and viral life cycles. Cell Host Microbe 2008;3:206.

Buchan JR, Parker R: Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. Mol Cell 2009;36:932–941.

Crick FH, Barnett L, Brenner S, et al: The genetic code. Nature 1961;192:1227.

Hinnebusch AG: Molecular Mechanism of Scanning and Start Codon Selection in Eukaryotes. Microbiology & Molecular Biology Reviews 2011;75:434–467.

Kimball SR, Jefferson, LS: Control of translation initiation through integration of signals generated by hormones, nutrients, and exercise. J Biol Chem 2009;285:29027–29032.

Kozak M: Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. J Biol Chem 1991;266:1986.

Liu CC, Schultz PG: Adding new chemistries to the genetic code. Annu Rev Biochem 2010;79:413–444.

Maquat LE, Tarn WY, Isken O: The pioneer round of translation: features and functions. Cell 2010;142:368–374.

Silvera D, Formenti SC, Schneider RJ: Translational control in cancer. Nat Rev Cancer 2010;10:254–266.

Sonenberg N, Hinnebusch AG: Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. Cell 2010;136:731–745.

Spriggs KA, Bushell M, Willis AE: Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. Mol Cell 2010;40:228–237.

Steitz TA, Moore PB: RNA, the first macromolecular catalyst: the ribosome is a ribozyme. Trends Biochem Sci 2003;28:411.

Wang Q, Parrish AR, Wang L: Expanding the genetic code for biological studies. Chem Biol 2009;16:323–336.

Weatherall DJ: Phenotype-genotype relationships in mogenic disease: Lessons from the thalassaemias. Nature Reviews Genetics 2001;2:245.

CAPÍTULO

38

Regulação da Expressão Gênica

P. Anthony Weil, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Explicar que as muitas etapas envolvidas nos processos vetoriais de expressão gênica, que variam da modulação dirigida do número de cópias de genes ao rearranjo gênico, à transcrição, ao processamento e ao transporte do mRNA a partir do núcleo à tradução, à modificação e à degradação de proteínas pós-tradução, estão submetidas ao controle regulatório, tanto positivo quanto negativo. Alterações em um ou vários desses múltiplos processos pode aumentar ou diminuir a quantidade e/ou atividade do produto gênico cognato.
- Reconhecer que os fatores de transcrição ligados ao DNA, proteínas que se ligam a sequências específicas de DNA que estão frequentemente localizadas próximas aos elementos promotores da transcrição, podem ou ativar ou reprimir a transcrição gênica.
- Identificar que os fatores de transcrição de ligação ao DNA são frequentemente proteínas modulares, compostas por domínios estrutural e funcionalmente distintos, que podem direta ou indiretamente controlar a transcrição gênica do mRNA, tanto por meio de contatos com a RNA-polimerase e seus cofatores quanto por interações com correguladores que modulam a estrutura do nucleossomo por meio de modificações covalentes e/ou deslocamento.
- Compreender que os eventos reguladores direcionados pelo nucleossomo geralmente aumentam ou diminuem a acessibilidade do DNA subjacente, tais como sequências intensificadoras (*enhancer*) ou promotoras, embora modificação do nucleossomo também possa criar novos sítios de ligação para outros correguladores.
- Perceber que os processos de transcrição, processamento do RNA e exportação nuclear do RNA estão todos acoplados.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Os organismos se adaptam às mudanças ambientais alterando a expressão gênica. Os mecanismos que controlam a expressão gênica foram estudados em detalhe e frequentemente envolvem a modulação da transcrição gênica. O controle da transcrição resulta, em última análise, em mudanças no modo de interação de moléculas reguladoras específicas, geralmente proteínas, com várias regiões de DNA do gene controlado. Tais interações podem ter tanto um efeito positivo quanto negativo na transcrição. O controle da transcrição pode resultar em expressão gênica tecidual-específica, sendo a regulação gênica influenciada por hormônios, metais pesados e substâncias químicas. Além dos controles em nível de transcrição, a expressão gênica também pode ser modulada pela amplificação do gene, pelo rearranjo gênico, pelas modificações pós-transcrição, pela estabilização do RNA, pelo controle de tradução, pela modificação e estabilização de proteínas. Muitos dos mecanismos que controlam a expressão gênica são utilizados para responder a sinais de desenvolvimento, fatores de crescimento, hormônios, agentes ambientais e medicamentos terapêuticos. A desregulação da expressão gênica pode levar a doenças em seres humanos. Portanto, uma compreensão molecular desses processos levará ao desenvolvimento de agentes que alteram os mecanismos

fisiopatológicos ou inibem o funcionamento ou interrompem o crescimento de organismos patogênicos.

A EXPRESSÃO REGULADA DE GENES É NECESSÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO, A DIFERENCIAÇÃO E A ADAPTAÇÃO

A informação genética presente em cada célula somática normal de um organismo metazoário é praticamente idêntica. As exceções são encontradas naquelas poucas células que possuem genes amplificados ou rearranjados para realizar funções celulares especializadas ou células que sofreram transformação oncogênica. A expressão da informação genética deve ser regulada durante a ontogenia e diferenciação do organismo e seus componentes celulares. Além disso, para o organismo se adaptar ao seu ambiente e para conservar energia e nutrientes, a expressão da informação genética deve ser sincronizada a sinais extrínsecos e responder apenas quando necessário. Com a evolução dos organismos, mecanismos reguladores mais sofisticados apareceram, os quais fornecem ao organismo e às suas células a capacidade de resposta necessária para a sobrevivência em um ambiente complexo. As células de mamíferos possuem cerca de 1.000 vezes mais informação genética que a bactéria *Escherichia coli*. Uma grande parcela dessa informação genética adicional está provavelmente envolvida na regulação da expressão gênica durante a diferenciação de tecidos e em processos biológicos no organismo pluricelular e para assegurar que o organismo possa responder aos desafios ambientais complexos.

Em termos simples, há apenas dois tipos de regulação gênica: **regulação positiva** e **regulação negativa** (**Tabela 38-1**). Quando a expressão de informação genética é quantitativamente aumentada pela presença de um elemento regulador específico, a regulação é considerada positiva; quando a expressão da informação genética é diminuída pela presença de um elemento regulador específico, a regulação é considerada negativa. O elemento, ou a molécula, mediador da regulação negativa é chamado de um **regulador negativo**, um **silenciador** ou **repressor**; o mediador da regulação positiva é um **regulador positivo**, um **intensificador** (***enhancer***) ou **um ativador**. Entretanto, um **duplo negativo** tem o efeito de ação de um positivo. Assim, um efetor que inibe o funcionamento de um regulador negativo aparecerá como responsável por uma regulação positiva. Muitos sistemas regulados que parecem ser induzidos são, na verdade, **desreprimidos** no nível molecular (ver no Capítulo 9 a explicação desses termos).

TABELA 38-1 Efeitos da regulação positiva e negativa da expressão gênica

	Taxa de expressão gênica	
	Regulação negativa	**Regulação positiva**
Regulador presente	Diminuiu	Aumentou
Regulador ausente	Aumentou	Diminuiu

SISTEMAS BIOLÓGICOS EXIBEM TRÊS TIPOS DE RESPOSTAS TEMPORAIS A UM SINAL REGULADOR

A **Figura 38-1** mostra a extensão ou a quantidade de expressão gênica em três tipos de resposta temporal a um sinal indutor. A **resposta do tipo A** é caracterizada por um aumento da expressão gênica que é dependente da presença contínua do sinal indutor. Quando o sinal indutor é removido, a quantidade de expressão gênica diminui para seu nível basal, mas a quantidade aumenta repetidamente em resposta ao reaparecimento do sinal específico. Esse tipo de resposta é comumente observado em procariotos como reação a mudanças súbitas da concentração intracelular de um nutriente. É também observado em muitos organismos superiores após exposição a indutores, tais como hormônios, nutrientes ou fatores de crescimento (Capítulo 42).

A **resposta do tipo B** exibe um aumento transitório da expressão gênica, mesmo na presença contínua de um sinal regulador. Após a terminação do sinal regulador e de ter sido permitido à célula que ela se recuperasse, pode ser observada uma

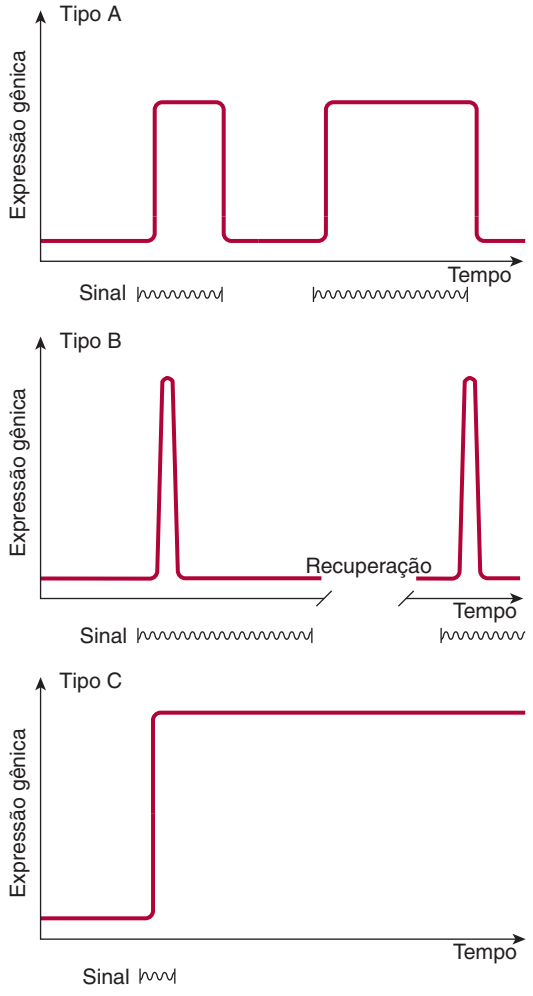


FIGURA 38-1 Representações diagramáticas das respostas do grau de expressão de um gene a sinais regulatórios específicos (tais como um hormônio em função do tempo).

segunda resposta transitória a um sinal regulador subsequente. Esse fenômeno de recuperação da resposta de dessensibilização caracteriza a ação de muitos agentes farmacológicos, mas também é uma característica de muitos processos que ocorrem naturalmente. Esse tipo de resposta comumente ocorre durante o desenvolvimento de um organismo, quando apenas o aparecimento transitório de um produto gênico específico é necessário, embora o sinal persista.

O padrão de **resposta do tipo C** exibe, em resposta ao sinal regulador, um aumento da expressão gênica que persiste indefinidamente, mesmo após a terminação do sinal. O sinal atua como um gatilho nesse padrão. Uma vez que a expressão gênica seja iniciada na célula, ela não pode ser encerrada, mesmo nas células-filhas; ela é, portanto, uma alteração irreversível e herdada. Esse tipo de resposta geralmente ocorre durante o desenvolvimento de funções diferenciadas em um tecido ou órgão.

Organismos unicelulares e pluricelulares simples servem como modelos valiosos para o estudo da expressão gênica em células de mamíferos

A análise da regulação da expressão gênica em células de procarióticos ajudou a estabelecer o princípio de que a informação segue do gene para um RNA mensageiro e daí para uma molécula de proteína específica. Esses estudos foram auxiliados pelas análises genéticas avançadas que puderam ser realizadas em organismos procarióticos e em organismos eucarióticos inferiores, tais como a levedura do fermento de bolo, *Saccharomyces cerevisiae*, e a mosca-da-fruta, *Drosophila melanogaster*, entre outros. Recentemente, os princípios estabelecidos nesses estudos, acoplados a uma variedade de técnicas de biologia molecular, levaram a um notável progresso na análise da regulação gênica em organismos eucarióticos superiores, incluindo mamíferos. Neste capítulo, a discussão inicial será centrada em sistemas de procariotos. Os impressionantes estudos genéticos não serão descritos, mas a fisiologia da expressão do gene será discutida. Entretanto, quase todas as conclusões sobre essa fisiologia derivaram de estudos genéticos e foram confirmadas por experimentos bioquímicos e de genética molecular.

Algumas características da expressão gênica de procariotos são singulares

Antes da fisiologia da expressão gênica poder ser explicada, alguns termos genéticos especializados e reguladores devem ser definidos para sistemas procarióticos. Em procarióticos, os genes envolvidos em uma via metabólica estão frequentemente presentes em uma série linear chamada de **óperon**, por exemplo, o óperon *lac*. O óperon pode ser regulado por um único promotor ou por uma única região reguladora. O **cistron** é a menor unidade de expressão gênica. Como descrito no Capítulo 9, algumas enzimas e outras moléculas de proteínas são compostas por duas ou mais subunidades não idênticas. Portanto, o conceito "um gene, uma enzima" não é necessariamente válido. O cistron é a unidade genética que codifica a estrutura da subunidade de uma molécula de proteína, atuando como a menor unidade de expressão gênica. Assim, a ideia de um gene, uma enzima pode ser mais precisamente considerada como um conceito de **um cistron, uma subunidade**. Um único mRNA que codifica mais de uma proteína traduzida separadamente é chamado de um **mRNA policistrônico**. Por exemplo, o mRNA policistrônico óperon *lac* é traduzido em três proteínas separadas (ver a seguir). Os mRNA óperons e policistrônicos são comuns em bactérias, mas não em eucariotos.

Um **gene induzível** é aquele cuja expressão aumenta em resposta a um **indutor** ou **ativador**, um sinal regulador positivo específico. Em geral, genes induzíveis possuem taxas de transcrição basal relativamente baixas. Por outro lado, genes com elevadas taxas de transcrição basal são frequentemente sujeitos à regulação inibidora por repressores.

A expressão de alguns genes é **constitutiva**, isto é, eles são expressos a uma taxa razoavelmente constante e parecem não estar sujeitos à regulação. Eles são geralmente chamados de **genes constitutivos** ou **genes *housekeeping***. Como um resultado de mutação, alguns produtos gênicos induzíveis se tornam constitutivamente expressos. Uma mutação que resulta em expressão constitutiva do que era anteriormente um gene regulado é chamada de **mutação constitutiva**.

A análise do metabolismo da lactose em *E. coli* levou à hipótese do óperon

Jacob e Monod, em 1961, descreveram o seu **modelo de óperon** em um artigo clássico. Sua hipótese era, em grande parte, baseada em observações da regulação do metabolismo da lactose da bactéria intestinal *E. coli*. Os mecanismos moleculares responsáveis pela regulação dos genes envolvidos no metabolismo da lactose estão, atualmente, entre os mais bem compreendidos em qualquer organismo. A β-galactosidase hidrolisa a lactose β-galactosídeo em galactose e glicose. O gene estrutural da β‴-galactosidase (*lacZ*) é agrupado com os genes responsáveis pela permeação da lactose para o interior da célula (*lacY*) e pela tiogalactosídeo transacetilase (*lacA*). Os genes estruturais para essas três enzimas, juntamente ao promotor *lac* e ao operador *lac* (uma região reguladora), estão fisicamente associados para constituir o **óperon *lac*** como mostrado na **Figura 38-2**. Esse arranjo genético dos genes estruturais e de seus genes reguladores permite a **expressão coordenada** das três enzimas envolvidas no metabolismo da lactose. Cada um desses genes ligados é transcrito em uma grande molécula policistrônica de mRNA que contém múltiplos códons independentes de início (AUG) e de parada (UAA) de tradução para cada um dos três cistrons. Assim, cada proteína é traduzida separadamente, e não são processadas a partir de uma única grande proteína precursora.

Atualmente, é convencional considerar que um gene inclui sequências reguladoras, bem como a região que codifica o trans-

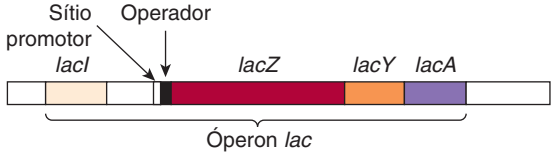
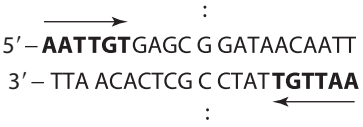


FIGURA 38-2 As relações de posicionamento dos genes estruturais e reguladores do óperon *lac*. O *lacZ* codifica a β-galactosidase, o *lacY*, uma permease e o *lacA* codifica uma tiogalactosida transacetilase. O *lacI* codifica a proteína repressora do óperon *lac*.

crito primário. Embora existam muitas exceções históricas, um gene é geralmente escrito em letras minúsculas e em itálico, e a proteína codificada, quando abreviada, é expressa em algarismo romano com a primeira letra maiúscula. Por exemplo, o gene *lacI* codifica a proteína repressora LacI. Quando a *E. coli* é colocada em presença da lactose ou de alguns análogos de lactose específicos, em condições apropriadas de não repressão (p. ex., altas concentrações de lactose, nenhuma ou pouca glicose no meio; ver a seguir) a expressão das atividades de β-galactosidase, galactosídeo permease e tiogalactosídeo transacetilase é aumentada em 100 a 1.000 vezes. Essa é uma resposta do tipo A, como mostrado na Figura 38-1. A cinética da indução pode ser muito rápida; mRNA *lac*-específicos são totalmente induzidos 5 a 6 min após a adição de lactose à cultura. A proteína β-galactosidase é máxima em 10 min. Sob condições totalmente induzidas, podem existir até 5.000 moléculas de β-galactosidase por célula, quantidade cerca de mil vezes maior do que o nível basal não induzido. Após a remoção do sinal, isto é, do indutor, a síntese dessas três enzimas diminui.

Quando a *E. coli* é exposta tanto à lactose quanto à glicose como fontes de carbono, os organismos metabolizam primeiro a glicose e, então, temporariamente param de crescer, até que os genes do óperon *lac* sejam induzidos a fornecer a capacidade de metabolizar a lactose como fonte de energia utilizável. Embora a lactose esteja presente desde a fase inicial de crescimento da bactéria, a célula não induz aquelas enzimas necessárias para o catabolismo da lactose até que a glicose tenha se esgotado. Este fenômeno foi inicialmente atribuído à repressão do óperon *lac* por alguns catabólitos de glicose; portanto, foi denominado de repressão catabólica. Atualmente, sabe-se que a repressão catabólica é, na verdade, mediada por uma **proteína ativadora do catabolismo** (**CAP**) em conjunto com o **AMPc** (Figura 17-5). Essa proteína é também chamada de proteína reguladora de AMPc (CRP). A expressão de muitos sistemas enzimáticos induzíveis ou óperons em *E. coli* e em outros procariotos é sensível à repressão catabólica, como discutido adiante.

A fisiologia da indução do óperon *lac* é bem compreendida no nível molecular (**Figura 38-3**). A expressão do gene *lacI* normal do óperon *lac* é constitutiva; ela é expressa a uma taxa constante, resultando na formação de subunidades do **repressor lac**. Quatro subunidades idênticas com pesos moleculares de 38.000 formam uma molécula tetramérica repressora Lac. A molécula de proteína repressora LacI, produto do *lacI*, possui uma alta afinidade (constante de dissociação, K_d de cerca de 10^{-13} mol/L) para o *locus* operador. O ***locus* operador** é uma região da fita dupla de DNA que exibe simetria rotacional dupla e um palíndromo invertido (indicado por setas perto do eixo pontilhado) em uma região de 21 pb de comprimento, como mostrado abaixo:



A qualquer momento, apenas duas das quatro subunidades do repressor parecem se ligar ao operador e, no interior da região dos 21 pares de bases, quase todas as bases de cada par estão envolvidas no reconhecimento e ligação do LacI. A ligação ocorre principalmente na **cavidade maior**, sem interromper a natureza de bases pareadas e dupla-hélice do DNA operador. O ***locus* operador** está entre o **sítio promotor** – ao qual a RNA-polimerase dependente de DNA se liga para iniciar a transcrição – e o sítio de início da transcrição do **gene lacZ**, o gene estrutural para a β-galactosidase (Figura 38-2). Quando ligado ao *locus* operador, a molécula repressora LacI impede a transcrição dos genes estruturais distais, *lacZ, lacY,* e *lacA*, interferindo na ligação da RNA-polimerase ao promotor; a RNA-polimerase e o repressor LacI não podem se ligar efetivamente ao óperon *lac* ao mesmo tempo. Assim, a molécula repressora LacI é um **regulador negativo**; em sua presença (e na ausência de indutor; ver a seguir), a expressão dos genes *lacZ, lacY,* e *lacA* é muito, muito baixa. Há normalmente 20 a 40 moléculas tetraméricas repressoras na célula, uma concentração de tetrâmero suficiente para efetuar, em um tempo qualquer, mais de 95% de ocupação do elemento operador *lac* em uma bactéria, garantindo, portanto, um nível baixo (mas não zero) de transcrição de gene óperon *lac* basal na ausência de sinais indutores.

Um análogo da lactose que é capaz de induzir o óperon *lac,* embora, ele mesmo, não sirva como um substrato para a β-galactosidase, é um exemplo de um **indutor gratuito**. Um exemplo é o isopropiltiogalactosídeo (IPTG). A adição de lactose ou de um indutor gratuito como o IPTG a bactérias crescendo em uma fonte de carbono pobremente utilizada (como o succinato) resulta na indução imediata de enzimas do óperon *lac*. Pequenas quantidades do indutor gratuito ou de lactose são capazes de entrar na célula, mesmo na ausência de permease. As moléculas repressoras do LacI – tanto as ligadas aos *loci* dos operadores quanto aquelas livres no citosol – possuem alta afinidade pelo indutor. A ligação do indutor à molécula repressora induz uma mudança conformacional na estrutura do repressor e o leva a se dissociar do operador do DNA, pois sua afinidade pelo operador é, agora, 10^4 vezes menor (K_d de cerca de 10^{-9} mol/L) do que aquela do LacI na ausência de IPTG. A RNA-polimerase dependente de DNA pode, agora, se ligar ao promotor (i.e., Figuras 36-3 e 36-8), e a transcrição irá começar, embora esse processo seja relativamente ineficaz (ver a seguir). Desse modo, **um indutor desreprime um óperon *lac*** e permite a transcrição de genes estruturais de β-galactosidase, galactosídeo permease e tiogalactosídeo transacetilase. A tradução do mRNA policistrônico pode ocorrer, mesmo antes da transcrição ser completada. A desrepressão do óperon *lac* permite à célula sintetizar as enzimas necessárias para catabolizar a lactose como uma fonte de energia. Com base na fisiologia recém-descrita, a expressão induzida por IPTG de plasmídeos transfectados portando o promotor-operador *lac* ligados às construções adequadas feitas por bioengenharia é comumente utilizada para expressar proteínas recombinantes de mamíferos em *E. coli*.

Para que a RNA-polimerase forme um PIC no sítio do promotor de maneira mais eficiente, também deve estar presente a **CAP**, ao qual o AMPc é ligado. Por um mecanismo independente, a bactéria acumula AMPc apenas quando é privada de uma fonte de carbono. Na presença de glicose – ou de glicerol em concentrações suficientes para o crescimento – a bactéria não possuirá AMPc suficiente para se ligar à CAP, porque a glicose inibe a adenilil-ciclase, a enzima que converte ATP em AMPc (ver Capítulo 41). Assim, em presença de glicose ou glicerol, o CAP saturado de AMPc está ausente, de modo que a RNA-polimerase

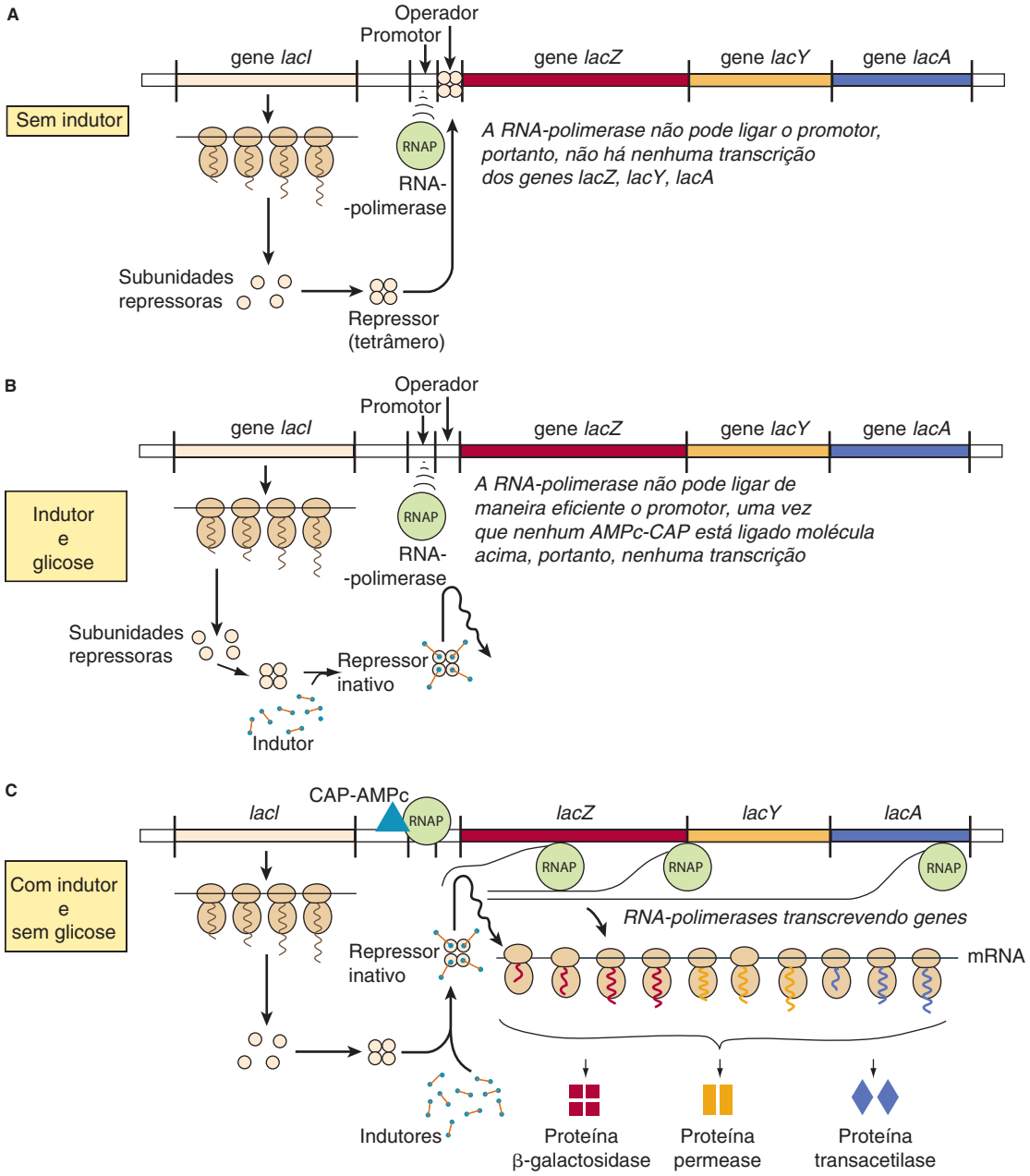


FIGURA 38-3 O mecanismo de repressão e desrepressão do óperon *lac*. Quando nenhum indutor está presente (**A**), o gene *lacI* sintetizado constitutivamente produz formas de uma molécula tetrâmera repressora que se liga no *locus* do operador. A ligação repressor-operador impede a ligação da RNA-polimerase e, consequentemente, impede a transcrição dos genes estruturais *lacZ, lacY* e *lacA* em um mRNA policistrônico. Quando o indutor está presente, mas também há a presença de glicose no meio de cultura **(B)**, as moléculas repressoras tetraméricas são conformacionalmente alteradas pelo indutor e não conseguem se ligar de maneira eficiente ao *locus* do operador (afinidade da ligação reduzida em mais de 1.000 vezes). A RNA-polimerase não irá ligar o promotor de maneira eficiente e iniciar a transcrição e, portanto, o óperon não é transcrito. Entretanto, quando o indutor está presente e o meio está desprovido de glicose (**C**) a adenil-ciclase é ativada e o AMPc, produzido. O AMPc se liga com grande afinidade à sua proteína de ligação, a Proteína Ativadora de AMP Cíclico, ou CRP. O complexo AMPc-CAP se liga à sua sequência de reconhecimento (CRE, o Elemento de Resposta ao AMPc) localizado cerca de 15 pb acima do promotor. O contato direto proteína-proteína entre a CRE ligada à CAP e a RNA-polimerase aumenta as ligações do promotor em mais de 20 vezes; portanto, a RNAP irá transcrever de maneira eficiente os genes estruturais *lacZ, lacY*, e *lacA* e a molécula policistrônica de mRNA formada pode ser traduzida nas moléculas de proteína correspondentes β-galactosidase, permease e transacetilase como mostrado, o que permite o catabolismo de lactose como a única fonte de carbono para o crescimento.

dependente de DNA não pode iniciar a transcrição do óperon *lac* na sua taxa máxima. Entretanto, em presença do complexo CAP–AMPc, que se liga ao DNA logo acima do sítio promotor, a transcrição ocorre nos níveis máximos (Figura 38-3). Estudos indicam que uma região da CAP se contacta diretamente à subunidade α da RNA-polimerase, e essas interações proteína–proteína facilitam a ligação da RNAP ao promotor. Portanto, o regulador CAP–AMPc atua como um **regulador positivo**, porque sua presença é necessária para a expressão gênica ótima. O óperon *lac* é, portanto, controlado por dois diferentes *trans*-fatores de ligação ao DNA modulados por ligantes; um que atua positivamente (complexo AMPc–CRP), para facilitar a ligação produtiva da RNA-polimerase ao promotor, e outro que atua negativamente (repressor LacI), que antagoniza a ligação da RNA-polimerase ao promotor. A atividade máxima do óperon *lac* ocorre quando os níveis de glicose estão baixos (alto AMPc com ativação da CAP) e a lactose está presente (LacI é impedida de se ligar ao operador).

Quando o gene *lacI* sofre mutações, de modo que o seu produto LacI não é capaz de se ligar ao DNA operador, o organismo irá exibir **expressão constitutiva** do óperon *lac*. De um modo inverso, um organismo com uma mutação do gene *lacI*, que produz uma proteína LacI que impede a ligação de um indutor ao repressor, permanecerá reprimido mesmo na presença da molécula indutora, porque o indutor não pode se ligar ao repressor no *locus* do operador para desreprimir o óperon. Do mesmo modo, bactérias que abrigam mutações em seu *locus* operador *lac*, de modo que a sequência do operador não irá se ligar a uma molécula repressora normal, constitutivamente expressam os genes do óperon *lac*. Os mecanismos de regulação positiva e negativa, comparáveis àqueles descritos aqui para o sistema *lac*, foram observados em células de eucariotos (ver a seguir).

O interruptor genético do bacteriófago lambda (λ) fornece outro paradigma para as interações e para a regulação transcricional proteína–DNA em células de eucariotos

Como alguns vírus de eucariotos (p. ex., vírus do herpes simplex e HIV), alguns vírus de bactérias podem também residir em um estado dormente no interior dos cromossomos do hospedeiro ou podem se replicar no interior de uma bactéria e, eventualmente, levar à lise e à morte do hospedeiro bacteriano. Algumas *E. coli* abrigam um desses vírus "temperados", o bacteriófago lambda (λ). Quando o lambda infecta um organismo dessa espécie, ele injeta seu genoma de DNA linear de fita dupla de 45.000 pb na célula (**Figura 38-4**). Dependendo do estado nutricional da célula, o DNA lambda se **integra** ao genoma do hospedeiro (**via lisogênica**) e permanece inativo até ser ativado (ver a seguir), ou começa a se **replicar** até ter feito cerca de 100 cópias completas de vírus com proteínas compactadas, quando então provoca a lise do seu hospedeiro (**via lítica**). As partículas virais recém-produzidas podem, então, infectar outros hospedeiros suscetíveis. Condições de crescimento ruins favorecem a lisogenia, enquanto boas condições de crescimento promovem a via lítica do crescimento lambda.

Quando integrado ao genoma do hospedeiro em seu estado inativo, o lambda irá permanecer nesse estado até ser ativado por exposição do seu hospedeiro bacteriano a agentes deletérios ao

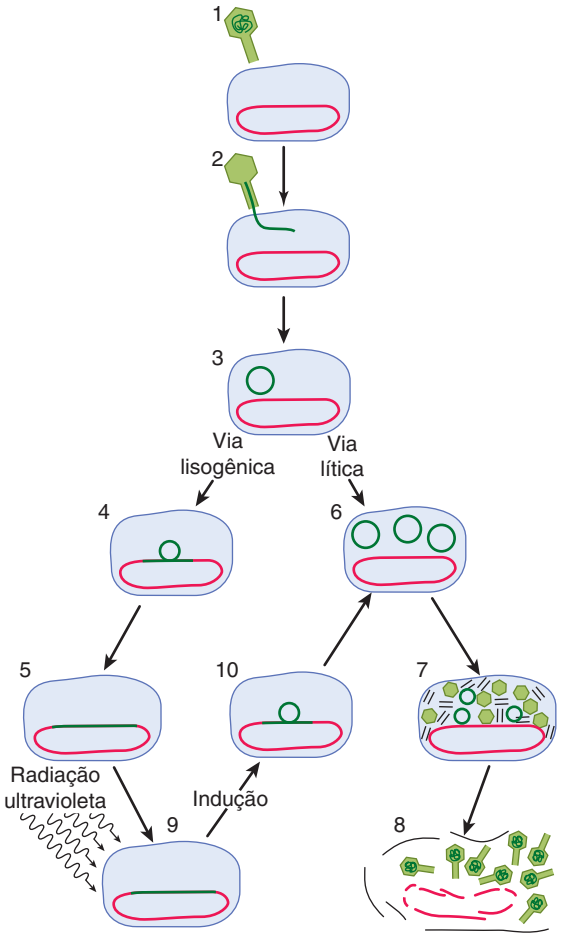


FIGURA 38-4 Infecção da bactéria *E. coli* pelo fago lambda começa quando uma partícula viral se prende a receptores específicos na célula bacteriana (1) e injeta seu DNA (linha verde-escura) na célula (2, 3). A infecção pode tomar um de dois caminhos dependendo de qual dos dois conjuntos de genes virais é ativado. Na via lisogênica, o DNA viral se torna integrado ao cromossomo bacteriano (**vermelho**) (**4, 5**), onde ele se replica passivamente como DNA bacteriano e a célula se divide. Esse vírus inativo genomicamente integrado é chamado de profago e a célula que o abriga é chamada de lisogênio. No alternativo modo de infecção lítico, o DNA viral se replica (**6**) e dirige a síntese de proteínas virais (**7**). Cerca de 100 novas partículas virais são formadas. Os vírus em proliferação induzem a lise da célula (**8**). Um profago pode ser "induzido" por um agente deletério como a radiação ultravioleta (**9**). O agente indutor ativa um desvio de modo que um conjunto diferente de genes é ligado. O DNA viral sai do cromossomo (**10**) e se replica; o vírus prossegue ao longo da via lítica. (Reproduzida com a permissão de Ptashne M, Johnson AD, Pabo CO: A genetic switch in a bacterial virus. Sci Am [Nov] 1982;247:128).

DNA. Em resposta a tal estímulo nocivo, o bacteriófago inativo se torna "induzido" e começa a transcrever e, subsequentemente, a traduzir aqueles genes do seu próprio genoma que são necessários para a sua excisão do cromossomo do hospedeiro, a replicação do seu DNA e a síntese de sua cobertura proteica e de suas enzimas líticas. Esse evento atua como gatilho ou resposta do tipo C (Figura 38-1); isto é, uma vez que o lambda inativo tenha se comprometido com a indução, não há volta até que a célula

seja lisada e o bacteriófago replicado liberado. Essa mudança de um estado inativo, ou **estado profago**, para uma **infecção lítica** é bem compreendida nos níveis genético e molecular e será descrita em detalhe aqui; embora bem menos compreendido no nível molecular, o HIV e o vírus do herpes podem ter comportamento semelhante.

O evento de interruptor genético lítico/lisogênico no lambda é centrado em torno de uma região de 80 pb em seu genoma de DNA de dupla-fita chamado de "operador direito" (O_R) (**Figura 38-5A**). O **operador direito** é ladeado no seu lado esquerdo pelo gene estrutural para a proteína repressora lambda, *cI*, e no seu lado direito pelo gene estrutural que codifica outra proteína reguladora chamada *cro*. Quando o lambda está em seu estado profago – isto é, integrado no genoma do hospedeiro – o gene repressor *cI* é o único gene lambda que é expresso. Quando o bacteriófago está em crescimento lítico, o gene repressor *cI* não está expresso, mas o gene *cro* – bem como muitos outros genes lambda – está expresso. Isto é, **quando o gene repressor está ligado, o gene *cro* está desligado, e quando o gene *cro* está ligado, o gene repressor *cI* está desligado**. Como será visto, esses dois genes regulam a expressão um do outro e, portanto, em última análise, a decisão entre o crescimento lítico ou lisogênico do lambda. **Essa decisão entre a transcrição do gene repressor e a transcrição do gene *cro* é um exemplo paradigmático de um interruptor transcricional molecular**.

O operador direito lambda de 80 pb, O_R, pode ser subdividido em três elementos de DNA *cis*-ativo de 17 pb, discretos e uniformemente espaçados, que representam os sítios de ligação para uma das duas proteínas reguladoras do bacteriófago lambda. De modo importante, as sequências de nucleotídeos desses três sítios arranjados em conjunto são semelhantes, mas não idênticas (**Figura 38-5B**). Os três elementos *cis* relacionados denominados operadores O_R1, O_R2 e O_R3 podem ser ligados por proteínas cI ou cro. Entretanto, as afinidades relativas de cI e cro para cada um dos sítios varia, e esta afinidade de ligação diferenciada é central para o funcionamento adequado do "interruptor molecular" do fago lambda lítico ou lisogênico. A região do DNA entre os genes *cro* e repressor também contém duas sequências promotoras que direcionam a ligação da RNA-polimerase em uma orientação específica, em que ela começa a transcrever genes adjacentes. Um promotor direciona a RNA-polimerase para transcrever **para a direita** e, portanto, transcrever o *cro* e outros genes distais, enquanto o outro promotor direciona a transcrição do gene **repressor *cI* para a esquerda** (Figura 38-5B).

O produto do gene repressor, a **proteína repressora** *cI*, com 236 aminoácidos e 27 kDa, é uma molécula com **dois domínios** em que o **domínio aminoterminal se liga ao DNA operador** e o **domínio carboxila terminal promove a associação** de uma proteína repressora com outra para formar um **dímero**. Um **dímero** de moléculas repressoras se liga ao **DNA operador** muito mais fortemente do que as formas monoméricas (**Figuras 38-6A a 38-6C**).

O produto do gene *cro*, a **proteína Cro** de 66 aminoácidos e com 9 kDa, possui um único domínio, mas também se liga ao DNA operador mais fortemente, como um **dímero** (**Figura 38-6D**). O domínio único da proteína Cro faz a mediação tanto da ligação com o operador quanto a dimerização.

Em uma bactéria lisogênica – isto é, uma bactéria que contém um profago lambda inativo integrado – o dímero repressor lambda se liga **preferencialmente ao O_R1**, mas ao fazer isso, por meio de uma interação cooperativa, estimula a ligação (em cerca de 10 vezes) de outro dímero repressor ao O_R2 (**Figura 38-7**). A afinidade do repressor por O_R3 é a menor das três sub-regiões do operador. A ligação do repressor à O_R1 tem dois efeitos principais. Primeiro, a ocupação do O_R1 pelo repressor **bloqueia a ligação da RNA-polimerase ao promotor direcionado para a direita** e, deste modo, impede a expressão do *cro*. Segundo, como mencionado anteriormente, o dímero repressor ligado ao O_R1 estimula a ligação do dímero repressor ao O_R2. A ligação do repressor ao O_R2 tem um efeito adicional importante de **estimular a ligação da RNA-polimerase ao promotor direcionado para a esquerda**, que se sobrepõe ao O_R3 e, portanto, estimula a transcrição e subsequente expressão do gene repressor. Esse estímulo à transcrição é mediado por interações diretas proteína–proteína

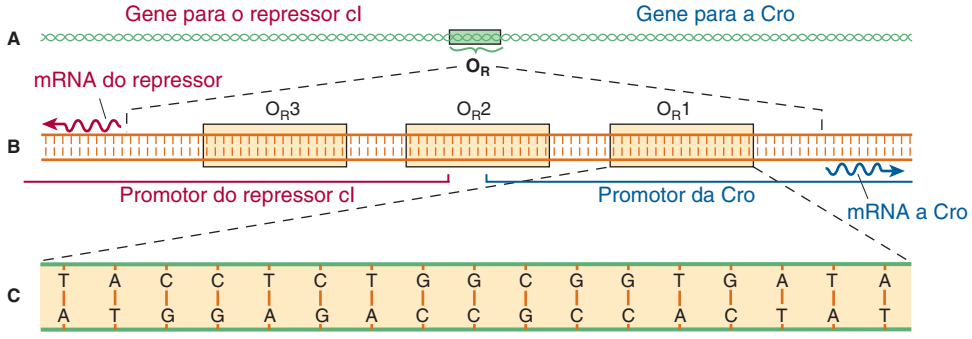


FIGURA 38-5 O operador direito (O_R) é mostrado em detalhes crescentes nesta série de imagens. O operador está em uma região do DNA viral com cerca de 80 pb de comprimento (**A**). À sua esquerda se encontra o gene que codifica o repressor lambda (cI), à sua direita está o gene (*cro*) codificando a proteína reguladora Cro. Quando a região do operador é aumentada (**B**), vê-se que ela inclui três subregiões, O_R1, O_R2, e O_R3, cada uma com 17 pb de comprimento. Eles são sítios de reconhecimento aos quais tanto o repressor quanto a Cro podem se ligar. Os sítios de reconhecimento se sobrepõem a duas sequências de promotores de bases às quais a RNA-polimerase se liga para transcrever esses genes em mRNA (linhas onduladas), que é traduzido em proteína. O sítio O_R1 é aumentado (**C**) para mostrar sua sequência de bases. Observe que na região O_R do cromossomo do lambda, ambas as fitas de DNA atuam como um molde para a transcrição (Reproduzida com a permissão de Ptashne M, Johnson AD, Pabo CO: A genetic switch in a bacterial virus. Sci Am [Nov] 1982;247:128).

entre a RNA-polimerase ligada ao promotor e o O_R2 ligado ao repressor, muito como descrito anteriormente para a proteína CAP e a RNA-polimerase no óperon *lac*. Portanto, o repressor lambda é tanto um **regulador negativo**, ao impedir a transcrição do *cro*, quanto um **regulador positivo**, estimulando a transcrição do seu próprio gene *cl*. Esse efeito duplo do repressor é responsável pelo estado estável do bacteriófago lambda inativo; não apenas o repressor evita a expressão dos genes necessários para a lise, mas ele também promove a sua própria expressão para estabilizar esse estado de diferenciação. Em um evento em que a concentração da proteína repressora intracelular se torna muito alta, esse excesso de repressor se ligará ao O_R3 e, agindo desse modo, diminui a transcrição do gene repressor pelo promotor direcionado para a esquerda, pelo bloqueio da ligação da RNAP ao promotor *cl*, até que a concentração do repressor caia e ele se dissocie do O_R3. Curiosamente, exemplos semelhantes de proteínas repressoras que também possuem a capacidade de ativar a transcrição foram observados em eucariotos.

Com tal estado lisogênico, estável, reprimido e mediado por cI, pode-se perguntar como o ciclo lítico poderia alguma vez ser introduzido. Entretanto, esse processo de fato ocorre de maneira muito eficiente. Quando um sinal danificador do DNA, como a radiação ultravioleta, atinge a bactéria lisogênica hospedeira, fragmentos do DNA de fita simples são produzidos a fim de ativar uma **coprotease** específica codificada por um gene bacteriano chamado de *recA* (Figura 38-7). A protease recA ativada hidrolisa a porção da proteína repressora que conecta os domínios do aminoterminal e do carboxilateral dessa molécula (ver Figura 38-6A). Tal clivagem dos domínios repressores faz **os dímeros repressores se dissociarem**, o que, por sua vez, leva à **dissociação das moléculas repressoras de O_R2** e, eventualmente, de O_R1**.** Os efeitos de remoção de repressor de O_R1 e O_R2 são previsíveis. A RNA-polimerase tem imediatamente acesso ao promotor direcionado para a direita e inicia a transcrição do **gene *cro***, e o efeito estimulante do repressor no O_R2, na transcrição direcionada para a esquerda, é perdido (Figura 38-7).

A proteína Cro resultante, recém-sintetizada, também se liga à região do operador como um dímero, mas a sua ordem de preferência é oposta à do repressor (Figura 38-7). Isto é, **Cro se liga mais fortemente ao O_R3**, mas não há efeito cooperativo do Cro em O_R3 na ligação do Cro ao O_R2. Em concentrações crescentemente elevadas de Cro, a proteína se ligará a O_R2 e, eventualmente, a O_R1**.**

A ocupação de O_R3 pela Cro imediatamente desliga a transcrição do promotor *cI* direcionado para a esquerda e, deste modo, **evita qualquer expressão adicional do gene repressor**. O interruptor molecular é, assim, completamente "lançado" na direção lítica. O gene *cro* é agora expresso, e o gene repressor é completamente desligado. Esse evento é irreversível, e a expressão de outros genes lambda se inicia como parte do ciclo lítico. Quando a concentração do Cro repressor se torna muito alta, ele irá eventualmente ocupar O_R1 e, agindo desta forma, irá reduzir a expressão de seu próprio gene, processo necessário para efetuar as etapas finais do ciclo lítico.

As estruturas tridimensionais de Cro e da proteína repressora lambda foram determinadas por cristalografia por raios X, e modelos para a sua ligação e efeitos nos eventos genéticos e moleculares, anteriormente descritos, foram propostos e testados. Ambos se ligam ao DNA utilizando os motivos de domínios (DBD) de ligação ao DNA hélice–volta–hélice. Até a presente data, esse sistema fornece, sem dúvida, a melhor compreensão dos eventos moleculares envolvidos na ativação e repressão gênica.

A análise detalhada do repressor lambda levou ao importante conceito de que as proteínas reguladoras da transcrição possuem vários domínios funcionais. Por exemplo, o repressor lambda se liga ao DNA com grande afinidade. Monômeros repressores formam dímeros, interagem cooperativamente entre si, e o repressor interage com a RNA-polimerase para estimular ou bloquear a li-

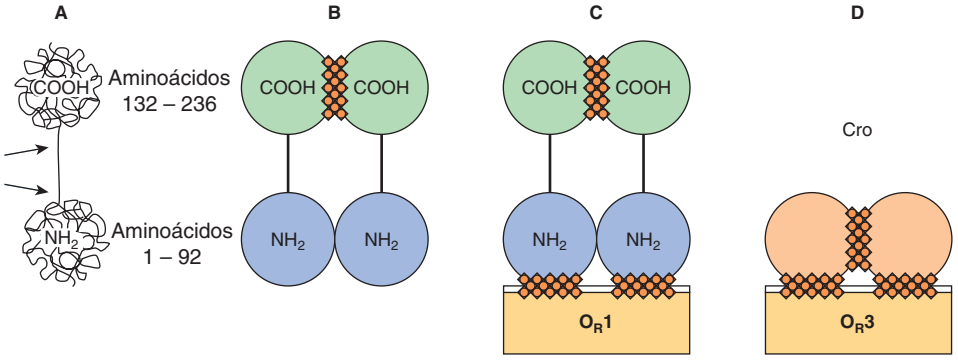


FIGURA 38-6 Estruturas moleculares esquemáticas de cI (repressor lambda, mostrado em A, B e C) e Cro (D). A proteína repressora lambda é uma cadeia polipeptídica de 236 aminoácidos de comprimento. A cadeia se dobra em uma forma de halteres com duas subestruturas: um domínio terminal amino (NH_2) e um domínio terminal carboxila (COOH). Os dois domínios são ligados por uma região da cadeia que é menos estruturada e suscetível à clivagem por proteases (indicada pelas duas setas em **A**). Moléculas repressoras únicas (monômeros) tendem a se associar reversivelmente para formar dímeros. **(B)** Um dímero é mantido unido principalmente pelo contato entre os domínios terminal carboxila (eclosão). Os dímeros repressores se ligam a (e podem se dissociar de) sítios de reconhecimento na região do operador; eles apresentam afinidades diferenciais para os três sítios de operadores, $O_R1 > O_R2 > O_R3$. **(C)** É o DBD da molécula repressora que entra em contato com o DNA (eclosão). A Cro **(D)** tem um único domínio com sítios que promovem a dimerização e com outros sítios que promovem a ligação dos dímeros ao operador. A cro exibe a mais alta afinidade pelo O_R3, o oposto da preferência de ligação de sequência da proteína cI. (Reproduzida com a permissão de Ptashne M, Johnson AD, Pabo CO: A genetic switch in a bacterial virus. Sci Am [Nov] 1982;247:128).

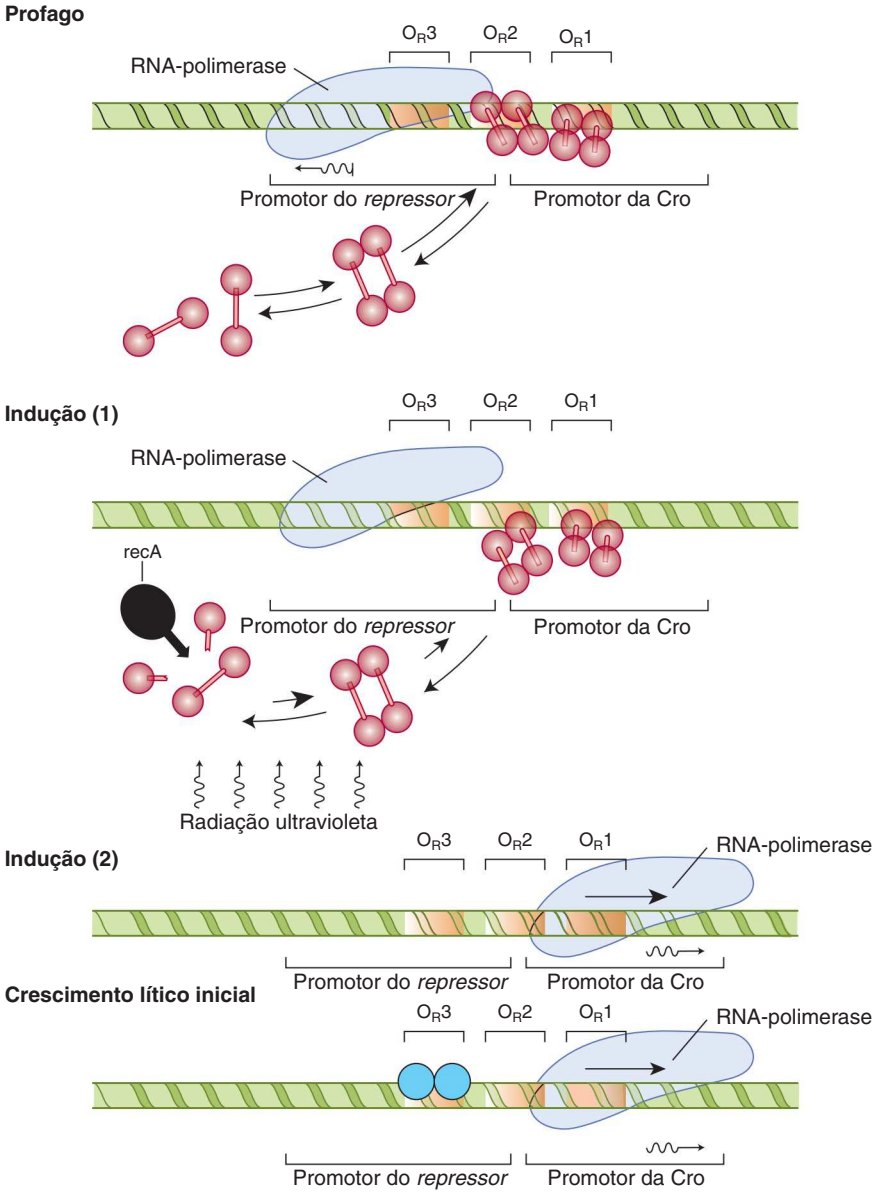


FIGURA 38-7 A configuração do interruptor lítico/lisogênico é mostrada em quatro estágios do ciclo de vida do lambda. A via lisogênica (na qual o vírus permanece inativo como um profago) é selecionada quando um dímero repressor se liga ao O_R1, tornando, assim, provável que o O_R2 seja preenchido imediatamente por outro dímero. No profago (**acima**), os dímeros repressores ligados a O_R1 e O_R2 impedem a RNA-polimerase de se ligar ao promotor direcionado para a direita e então bloqueia a síntese de Cro (controle negativo). Os repressores também estimulam a ligação da polimerase ao promotor direcionado para a esquerda (controle positivo), resultando na transcrição do gene repressor em RNA (linha ondulada) e na síntese de mais repressor, mantendo o estado lisogênico. O profago é induzido (**centro**) quando a radiação ultravioleta ativa a protease recA, que cliva os monômeros repressores. O equilíbrio entre monômeros livres, dímeros livres e dímeros ligados é assim alterado e os dímeros deixam os sítios do operador. A RNA-polimerase não é mais encorajada a se ligar ao promotor direcionado para a esquerda, de modo que o repressor não é mais sintetizado. À medida que a indução prossegue, todos os sítios do operador se tornam vazios, assim a polimerase pode se ligar ao promotor direcionado para a direita e a Cro é sintetizada. Durante o crescimento lítico inicial, um único dímero Cro se liga ao O_R3 (círculos sombreados de azul-claro), o sítio pelo qual ele tem maior afinidade. Consequentemente, a RNA-polimerase não pode se ligar ao promotor direcionado para a esquerda, mas o promotor direcionado para a direita permanece acessível. A polimerase continua a se ligar ali, transcrevendo *cro* e outros genes líticos iniciais. Segue-se o crescimento lítico (**embaixo**). (Reproduzida com a permissão de Ptashne M, Johnson AD, Pabo CO: A genetic switch in a bacterial virus.Sci Am [Nov] 1982;247:128).

gação do promotor ou a formação do complexo aberto de RNAP (ver Figura 36-3). A interface proteína–DNA e as três interfaces proteína–proteína envolvem domínios da molécula do repressor separados e distintos. Como será descrito adiante (ver Figura 38-19), essa é uma característica compartilhada pela maioria (talvez todas) das moléculas que regulam a transcrição.

CARACTERÍSTICAS ESPECIAIS ESTÃO ENVOLVIDAS NA REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DO GENE EUCARIÓTICO

A maior parte do DNA em células procarióticas está organizada em genes, e os moldes sempre têm o potencial de serem transcritos se *trans*-fatores positivos e negativos adequados forem ativados. Uma situação muito diferente ocorre em células de mamíferos, em que relativamente pouco do DNA total está organizado em genes que codificam mRNA e suas regiões reguladoras associadas. A função do DNA extra tem sido ativamente investigada (i.e., Capítulo 39; os Projetos ENCODE). Mais importante, como descrito no Capítulo 35, o DNA em células de eucariotos é extensamente dobrado e compactado no complexo proteína–DNA chamado cromatina. As histonas são uma parte importante desse complexo uma vez que formam tanto as estruturas conhecidas como nucleossomos (ver Capítulo 35) como também afetam significativamente os mecanismos reguladores de genes, como destacado adiante.

O molde de cromatina contribui de modo importante para o controle da transcrição dos genes de eucariotos

A **estrutura da cromatina** fornece um nível adicional de controle da transcrição gênica. Como discutido no Capítulo 35, grandes regiões de cromatina são inativas transcricionalmente, enquanto outras podem ser ativas ou potencialmente ativas. Com raras exceções, cada célula contém o mesmo complemento de genes. O desenvolvimento de células, tecidos e órgãos especializados e suas funções no organismo intacto dependem da expressão diferencial de genes.

Algumas dessas expressões diferenciais se devem à presença de diferentes regiões de cromatina disponíveis para a transcrição em células de vários tecidos. Por exemplo, o DNA que contém o agrupamento de genes da globina β está em uma **cromatina** "**ativa**" no reticulócito, mas em uma **cromatina** "**inativa**" nas células musculares. Todos os fatores envolvidos na determinação da cromatina ativa não foram elucidados. A presença de nucleossomos e de complexos de histonas e DNA (ver Capítulo 35) certamente fornece uma barreira contra a associação imediata entre fatores de transcrição e regiões específicas do DNA. A dinâmica da formação e a interrupção da estrutura do nucleossomo são, portanto, uma parte importante da regulação gênica de eucariotos.

A **modificação covalente da histona**, também chamada de **código da histona**, é um determinante importante da atividade gênica. As histonas estão submetidas a uma grande variedade de modificações pós-tradução específicas (Tabela 35-1). Essas modificações são dinâmicas e reversíveis. A acetilação e a desacetilação de histonas são melhor compreendidas. A descoberta surpreendente de que a histona-acetilase e outras atividades enzimáticas estão associadas a correguladores envolvidos na regulação da transcrição gênica (ver Capítulo 42) forneceu um novo conceito de regulação gênica. Sabe-se que a acetilação ocorre nos resíduos de lisina nas caudas aminoterminais das moléculas de histona e tem sido consistentemente correlacionada à transcrição ou, alternativamente, ao potencial transcricional. A acetilação da histona reduz a carga positiva dessas caudas e provavelmente contribui para uma diminuição na afinidade de ligação da histona pelo DNA negativamente carregado. Tal modificação covalente das histonas cria novos sítios de ligação para proteínas adicionais tais como os complexos de remodelação da cromatina dependentes de ATP, que contêm subunidades que transportam domínios estruturais, que se ligam especificamente às histonas que estavam submetidas aos PTMs correguladores depositados. Esses complexos podem aumentar a acessibilidade das sequências de DNA adjacentes por meio da remoção das histonas nucleossomais. Juntos, então, os correguladores (modificadores e remodeladores de cromatina), trabalhando em conjunto, podem abrir os promotores gênicos e as regiões reguladoras, facilitando a ligação de outros *trans*-fatores e da RNA-polimerase II e GTFs (ver Figuras 36-10 e 36-11). A desacetilação de histonas, catalisada pelos correpressores transcricionais, teria o efeito oposto. Proteínas diferentes com atividades acetilase e desacetilase específicas estão associadas a vários componentes do aparato transcricional. As proteínas que catalisam os PTMs de histonas são algumas vezes chamadas de "**escritoras do código**", enquanto as proteínas que reconhecem, ligam e interpretam esses PTMs de histonas são chamadas de "**leitoras do código**" e as enzimas que removem os PTMs de histonas são chamadas de "**apagadoras do código**". Coletivamente, então, os TPMs de histonas representam uma fonte de informação reguladora muito dinâmica e potencialmente rica. As regras exatas e os mecanismos que definem a especificidade desses vários processos estão em investigação. Alguns exemplos específicos são ilustrados no Capítulo 42. Várias empresas comerciais estão trabalhando no desenvolvimento de medicamentos que especificamente alterem a capacidade das proteínas que modulam o código das histonas.

Há evidências de que a **metilação dos resíduos de desoxicitidina**, **5MeC**, (na sequência 5′-^{me}CpG-3′) no DNA pode efetuar mudanças na cromatina, de modo a impedir a sua transcrição ativa, como descrito no Capítulo 35. Por exemplo, em fígado de camundongo, apenas os genes ribossomais não metilados podem ser expressos, e há evidências que muitos vírus de animais não são transcritos quando seus DNAs são metilados. A desmetilação intensa dos resíduos de 5MeC em regiões específicas de genes induzíveis por hormônio esteroide tem sido associada a um aumento da taxa de transcrição gênica. Entretanto, ainda não é possível generalizar que o DNA metilado é transcricionalmente inativo, que toda cromatina inativa é metilada ou que o DNA ativo não é metilado.

Finalmente, a ligação de fatores de transcrição específicos aos elementos do DNA cognato pode resultar na ruptura da estrutura nucleossomal. Muitos genes de eucariotos apresentam múltiplos elementos de DNA de ligação a proteínas. A ligação seriada de fatores de transcrição a esses elementos – de um modo

combinatório – pode diretamente romper a estrutura do nucleossomo, evitando a sua reformação, ou recrutar, por interações proteína–proteína, complexos correguladores multiproteicos que têm a capacidade de modificar e/ou remodelar de modo covalente os nucleossomos. Essas reações resultam em mudanças estruturais no nível da cromatina que, no final, aumentam a acessibilidade do DNA a outros fatores e à maquinaria de transcrição (conforme visto anteriormente).

O DNA de eucariotos que está em uma região "ativa" de cromatina pode ser transcrito. Como em células procarióticas, um **promotor** determina onde a RNA-polimerase irá iniciar a transcrição, mas o promotor em células de mamíferos (Capítulo 36) é mais complexo. Além disso, os fatores que atuam de modo *trans* geralmente são provenientes de outros cromossomos (e assim atuam no modo *trans*), enquanto esta consideração é discutível no caso do único cromossomo de células de procariotos. Uma complexidade adicional é acrescentada por elementos ou fatores que estimulam ou reprimem a transcrição, definem a expressão tecidual-específica, e modulam as ações de muitas moléculas efetoras. Finalmente, resultados recentes sugerem que a ativação e a repressão gênica devem ocorrer quando genes particulares se movem para dentro ou para fora de diferentes compartimentos ou locais subnucleares.

Mecanismos epigenéticos contribuem de modo importante para o controle da transcrição gênica

As moléculas e a biologia reguladora descrita anteriormente contribuem, de maneira importante, para a regulação transcricional. De fato, recentemente, o papel da modificação covalente do DNA e das proteínas histonas e não histonas, e dos recém-descobertos ncRNA, receberam enorme atenção no campo da pesquisa da regulação gênica, particularmente por meio da investigação sobre como tais modificações químicas e/ou moléculas estáveis alteram os padrões de expressão gênica sem alterar a sequência de genes do DNA subjacente. Esse campo de estudo foi chamado de **epigenética**. Como mencionado no Capítulo 35, um aspecto desses mecanismos, os PTM de histonas, foram chamados de **código de histona** ou código epigenético de histona. O termo "epigenética" significa "acima da genética" e se refere ao fato de que esses mecanismos reguladores não alteram a sequência de DNA regulada subjacente, mas simplesmente alteram os padrões de expressão desse DNA. Os mecanismos epigenéticos desempenham papéis fundamentais no estabelecimento, na manutenção e na reversibilidade dos estados transcricionais. Uma característica importante dos mecanismos epigenéticos é a de que os estados transcricionais controlados ligados/desligados (*on/off*) podem ser mantidos por muitos ciclos de divisão celular. Esta observação indica que devem existir mecanismos potentes para manter e propagar de modo estável esses estados epigenéticos.

Duas formas de sinais epigenéticos, sinais epigenéticos *cis* e *trans*, podem ser descritas; elas estão ilustradas esquematicamente na **Figura 38-8**. Um evento de sinalização *trans* simples, composto por retroalimentação transcricional positivo, mediado por um abundante transativador difusível, que se divide entre a célula-mãe e a célula-filha a cada divisão, é mostrado na Figura 38-8A. Desde que o fator de transcrição seja expresso em um nível suficiente para permitir que todas as células-filhas subsequentes herdem o sinal epigenético *trans* (fator de transcrição), tais células terão o fenótipo molecular ou celular determinado pelos outros genes alvo desse ativador transcricional. Mostrado na Figura 38-8 painel B está um exemplo de como um sinal epigenético *cis* (tal como uma marcação específica de metilação 5MeCpG) pode ser propagado de forma estável para as duas células-filhas após a divisão celular. A marcação do DNA hemimetilado (i.e., apenas uma das duas fitas de DNA sofre modificação 5MeC) gerada durante a replicação do DNA direciona a metilação da fita recém-replicada por meio da ação de metilases de DNA de manutenção ubíqua. Essa metilação 5MeC resulta em ambas as fitas filhas de DNA conterem a marcação epigenética *cis* completa.

Ambos os sinais epigenéticos *cis* e *trans* resultam em estados de expressão estáveis e herdados e, portanto, representam as respostas de expressão gênica do tipo C (i.e., Figura 38-1). Entretanto, é importante notar que ambos os estados podem ser reversíveis se os sinais epigenéticos *trans* ou *cis* forem removidos, por exemplo, extinguindo a expressão do fator de transcrição de execução (sinal *trans*) ou por remoção de um sinal epigenético *cis* de DNA (por meio da desmetilação do DNA). Foram descritas enzimas que, pelo menos *in vitro*, podem remover tanto as modificações das proteínas PTM quanto de 5MeC.

A transmissão estável dos estados epigenéticos liga/desliga (*on/off*) pode ser afetada por múltiplos mecanismos moleculares. São mostrados na **Figura 38-9** três modos pelos quais as marcações epigenéticas podem se propagar por meio de um ciclo de replicação de DNA. O primeiro exemplo da transmissão da marcação epigenética envolve a propagação das marcações 5MeC de DNA, e ocorre como descrito na Figura 38-8. O segundo exemplo de transmissão do estado epigenético ilustra como um PTM de histona nucleossomal (nesse exemplo, a histona H3 trimetilada na lisina K-27; H3K27me3) pode ser propagada. Neste exemplo, imediatamente após a replicação do DNA, tanto os nucleossomos H3K27me3 marcados quanto a H3 não marcada se reformam aleatoriamente em ambas as fitas filhas de DNA. O complexo repressor policomb 2 (PRC2), composto pelas subunidades de EEDSUZ12-EZH2 e RbAP, se liga ao nucleossomo que contém a marcação preexistente de H3K27me3 por meio da subunidade EED. A ligação do PRC2 a essa marcação de histona estimula a atividade de metilase da subunidade EZH2 do PRC2, que resulta na metilação local do H3 nucleossomal. A metilação da histona H3 leva, assim, à transmissão estável e completa da marcação epigenética H3K27me3 para ambas as cromátides. Finalmente, o *locus*/a sequência que tem como alvo especificamente os sinais epigenéticos *cis* da histona nucleossomal podem ser obtidos pela ação dos ncRNA, como mostrado na Figura 38-9, painel C. Neste caso, um ncRNA específico interage com as sequências de DNA alvo e o complexo RNA–DNA resultante é reconhecido por RBP, uma proteína ligadora de RNA. Assim, provavelmente por meio de uma proteína adaptadora específica (A), o complexo RNA–DNA–RBP recruta um complexo modificador de cromatina (CMC) que modifica localmente as histonas nucleossomais. Mais uma vez, esse mecanismo leva à transmissão de uma marcação epigenética estável.

Trabalhos adicionais serão necessários para estabelecer os detalhes moleculares completos desses processos epigenéticos, determinando quão ubiquamente esses processos ocorrem, identificando o complemento total das moléculas envolvidas e os genes contro-

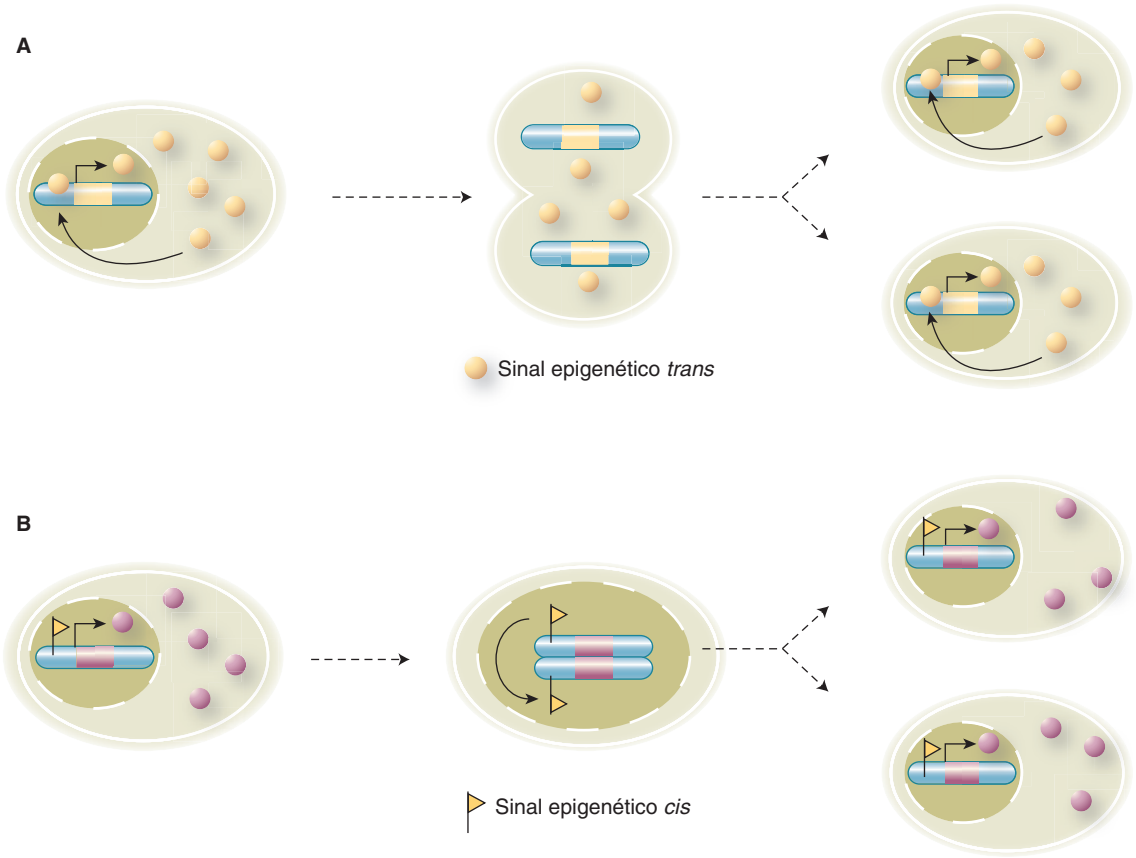


FIGURA 38-8 Os sinais epigenéticos *cis* e *trans*. (**A**) Um exemplo de um sinal epigenético que atua em *trans*. Uma proteína transativadora ligada ao DNA (círculo amarelo) é transcrita a partir de seu gene cognato (barra amarela) localizado em um cromossomo particular (azul). A proteína expressa é livremente difusível entre os compartimentos nuclear e citoplasmático. Observe que o excesso de transativador reentra no núcleo após a divisão celular, se liga ao seu próprio gene e ativa a transcrição em ambas as células-filhas. Esse ciclo restabelece o circuito de retroalimentação positivo em funcionamento antes da divisão celular, e assim reforça a expressão estável dessa proteína ativadora transcricional em ambas as células. (**B**) Um sinal *cis*-epigenético; um gene (cor-de-rosa) localizado em um cromossomo particular (azul) carrega um sinal epigenético *cis* (pequena bandeira amarela) no interior da região regulatória a montante da unidade de transcrição gênica rosa. Neste caso, o sinal epigenético é associado à transcrição gênica ativa e à subsequente produção do produto gênico (círculos cor-de-rosa). Durante a replicação do DNA, a cromatina recém-replicada serve como um molde que provoca e molda a introdução do mesmo sinal epigenético, ou marcação, na cromátide recém-sintetizada sem marcação. Consequentemente, ambas as células-filhas contêm o gene rosa em um estado *cis*-epigeneticamente marcado de modo semelhante, o que garante a expressão de um modo idêntico em ambas as células. Mais detalhes no texto. (Imagem retirada de Roberto Bonasio, R, Tu, S, Reinberg D (2010), "Molecular Signals of Epigenetic States". *Science* 330:612–616. Reimpresso com a permissão de AAAS).

lados. Os sinais epigenéticos são criticamente importantes para a regulação gênica, como evidenciado pelo fato de que as mutações e/ou a superexpressão de muitas das moléculas que contribuem para o controle epigenético levam a doenças em seres humanos.

Certos elementos do DNA estimulam ou reprimem a transcrição de genes de eucariotos

Além das alterações grosseiras da cromatina afetarem a atividade transcricional, certos elementos de DNA facilitam ou estimulam a iniciação no promotor e, portanto, são denominados de **intensificadores**. **Os elementos intensificadores, que geralmente contêm múltiplos sítios de ligação para proteínas transativadoras**, diferem do promotor de modo notável. Eles podem exercer sua influência positiva na transcrição mesmo quando separados por dezenas de milhares de pares de bases de um promotor; eles funcionam quando orientados em qualquer direção; e podem funcionar acima (5′) ou abaixo (3′) do promotor. Os intensificadores são promíscuos; eles podem estimular qualquer promotor próximo e podem atuar em mais de um promotor. O intensificador viral SV40 pode influenciar, por exemplo, a transcrição da globina β, aumentando sua transcrição 200 vezes em células que contêm tanto o intensificador SV40 quanto o gene da globina β no mesmo plasmídeo (ver a seguir e na **Figura 38-10**); nesse caso, o gene da globina β do intensificador SV40 foi construído utilizando-se a tecnologia do DNA recombinante – ver Capítulo 39. O elemento intensificador não produz um produto que, por sua vez, atua no promotor, uma vez que ele é ativo apenas quando existe na mesma molécula de DNA que o promotor (i.e., *cis*). As proteínas de ligação de intensificadores são responsáveis por esse efeito. Os

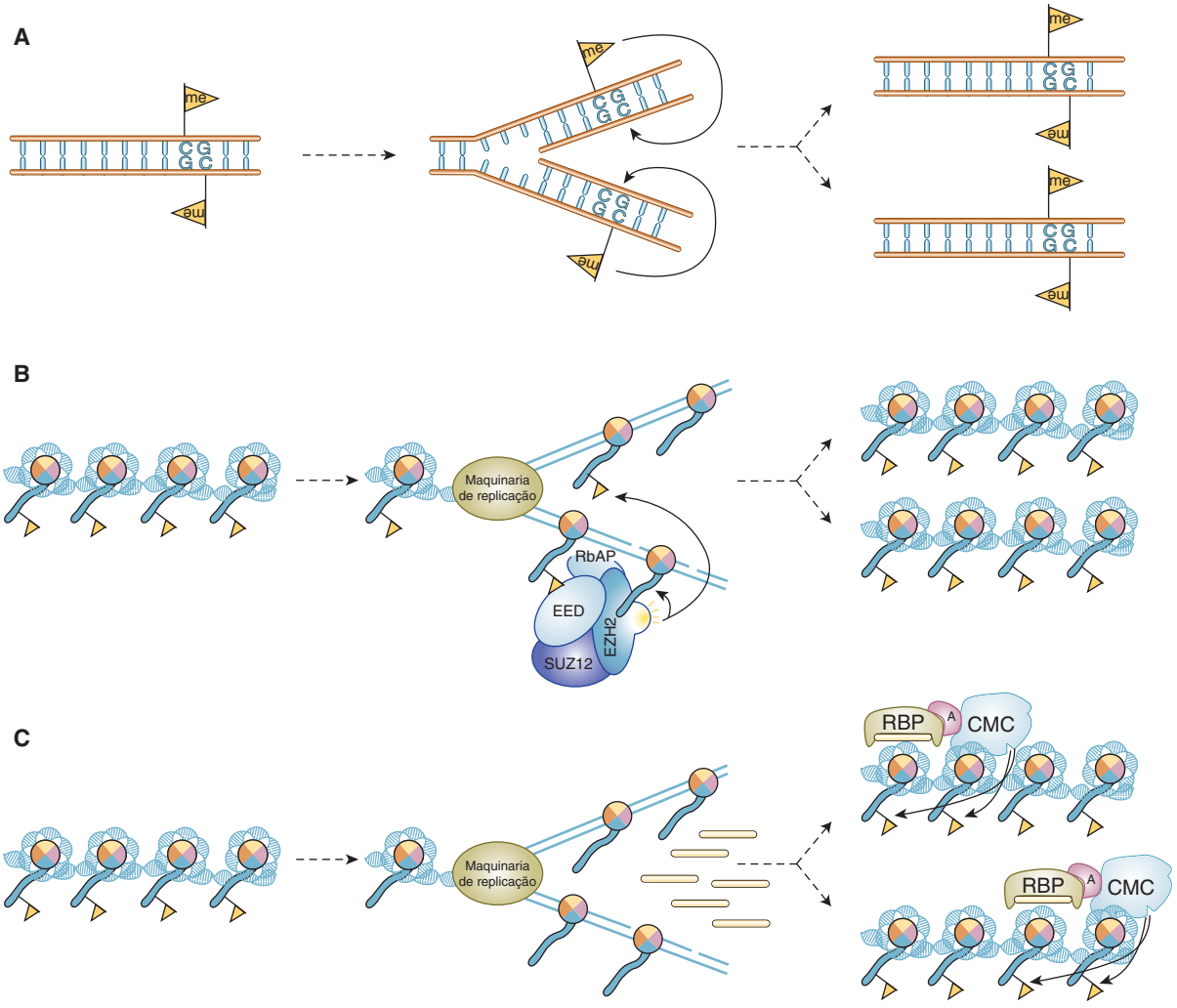


FIGURA 38-9 Mecanismos para a transmissão e propagação de sinais epigenéticos após um ciclo de replicação de DNA. (**A**) Propagação de um sinal 5MeC (bandeira amarela; ver Figura 38-8B). (**B**) Propagação de um sinal epigenético de marcação PTM em histonas (H3K27me) que é mediado pela ação do PRC2 CMC, uma proteína com quatro subunidades composta por EED, EZH2 metilase de histona, RbAP e SUZ12. Observe que, neste contexto, PRC2 é tanto um leitor do código da histona (pelo domínio de ligação da histona metilada em EED) quanto um escritor do código da histona (por meio do domínio SET da metilase da histona no interior de EZH2). A deposição local-específica do sinal *cis*-epigenético do PTM da histona é direcionada pelo reconhecimento das marcações H3K27me nas histonas nucleossomais preexistentes (bandeira amarela). (**C**) Outro exemplo da transmissão do sinal epigenético de uma histona (bandeira amarela), exceto que aqui o direcionamento dos sinais é mediado pela ação de pequenos ncRNA, que trabalham em conjunto com uma proteína ligadora de RNA (RBP), uma proteína adaptadora (A) e um CMC. Ver o texto para mais detalhes. (Imagem retirada de: Roberto Bonasio, R, Tu, S, Reinberg D (2010), "Molecular Signals of Epigenetic States". *Science* 330:612–616. Reimpresso com a permissão de AAAS).

mecanismos exatos pelos quais esses ativadores de transcrição funcionam são objeto de intensa investigação. Certamente, foi descoberto que os *trans*-fatores de ligação de intensificadores interagem com uma grande variedade de outras proteínas de transcrição. Essas interações incluem os coativadores modificadores de cromatina, o mediador, bem como os componentes individuais da maquinaria de transcrição da RNA-polimerase II basal. Em última análise, os eventos de ligação do intensificador-transfator do DNA resultam em um aumento na ligação da maquinaria de transcrição basal ao promotor. Os elementos intensificadores e as proteínas de ligação associadas frequentemente transmitem a hipersensibilidade da nuclease às regiões onde eles residem (Capítulo 35). Um resumo das propriedades dos intensificadores é apresentado na **Tabela 38-2**.

Um dos sistemas de intensificadores de mamíferos mais bem compreendidos é o do gene interferon β. Esse gene é induzido por infecção viral em células de mamíferos. Um dos objetivos da célula, quando infectada por um vírus, é o de tentar montar uma resposta antiviral – se não para salvar a célula infectada, para ajudar a salvar o organismo todo da infecção viral. A produção de interferon é um dos mecanismos pelo qual isso é conseguido. Essa família de proteínas é secretada por células infectadas por vírus. O interferon secretado interage com as células vizinhas para provocar uma inibição da replicação viral por vários mecanismos,

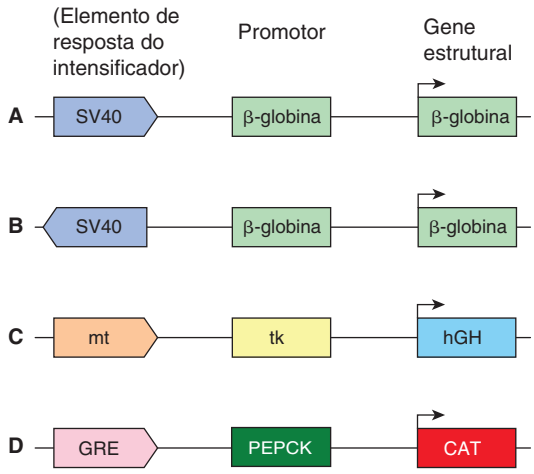


FIGURA 38-10 Esquema ilustrando a ação dos intensificadores e outros elementos reguladores com atuação *cis*. Estes genes de modelo quimérico, todos construídos por técnicas de DNA recombinante (Capítulo 39) *in vitro*, consistem em um gene repórter (estrutural) que codifica uma proteína que pode ser prontamente analisada e que não é normalmente produzida nas células a serem estudadas, um promotor que garante a iniciação precisa da transcrição e os elementos regulatórios indicados. Em todos os casos, a transcrição de alto nível das quimeras indicadas depende da presença de intensificadores, os quais estimulam a transcrição mais de 100 vezes acima dos níveis transcricionais basais (i.e., transcrição dos mesmos genes quiméricos contendo apenas promotores fusionados aos genes estruturais). Exemplos (**A**) e (**B**) ilustram o fato de que os intensificadores (p. ex., SV40) funcionam em qualquer direção e com um promotor heterólogo. O exemplo (**C**) ilustra que o elemento regulador metalotioneína (mt, que sob a influência de cádmio ou zinco induz a transcrição do gene mt endógeno e, portanto, da proteína mt ligadora de metais) irá funcionar por meio do promotor da timidinaquinase (tk) para estimular a transcrição do gene do hormônio de crescimento humano (hGH). As construções genéticas engendradas foram introduzidas nos pró-núcleos de embriões unicelulares de camundongos machos e nos embriões colocados no útero de uma mãe de aluguel para se desenvolver como animais transgênicos. Uma prole foi gerada nessas condições, e em alguns indivíduos a adição de íons zinco à água de beber teve como efeito um aumento na expressão do hormônio de crescimento no fígado. Neste caso, esses animais transgênicos responderam aos níveis elevados de hormônio de crescimento, se tornando duas vezes maiores que seus companheiros normais de ninhada. O exemplo (**D**) ilustra que um elemento de resposta aos glicocorticoides (GRE) irá funcionar por meio de promotores homólogos (gene PEPCK) ou heterólogos (não mostrados; i.e., promotor tk, promotor SV40, promotor β-globina, etc.) para dirigir a expressão do gene repórter cloranfenicol acetil transferase (CAT).

limitando, desse modo, a extensão da infecção viral. O elemento intensificador que controla a indução do gene do interferon β, que está localizado entre os nucleotídeos −110 e −45 em relação ao local de início da transcrição (+1), é bem caracterizado. O intensificador é composto por quatro grupos distintos de elementos *cis*, cada um ligado por fatores *trans* únicos. Um elemento *cis* está ligado ao fator *trans* NF-κB, o outro, a um membro da família IRF (fator regulador de interferon) de fatores *trans*, e um terceiro, ao fator zíper de leucina heterodimérico ATF-2/c-Jun (ver a seguir). O quarto fator é o fator de transcrição arquitetural abundante e ubíquo conhecido como HMG I(Y). Após se ligar aos seus sítios de ligação ricos em A+T, o HMG I(Y) induz uma curvatura significativa no DNA. Há quatro desses sítios de ligação HMG I(Y) intercalados ao longo do intensificador. Esses sítios desempenham um papel crítico na formação de uma estrutura 3D particular, juntamente aos três fatores *trans* mencionados anteriormente, ao induzir uma série de curvas criticamente espaçadas no DNA. Consequentemente, o HMG I(Y) induz a formação cooperativa de uma estrutura 3D única, estereoespecífica, no interior da qual todos os quatro fatores são ativados quando os sinais de infecção viral são percebidos pela célula. A estrutura formada pela montagem cooperativa desses quatro fatores é denomina de acentuassomo do interferon β (ver **Figura 38-11**), assim denominado por sua óbvia semelhança estrutural ao nucleossomo, que também é uma estrutura tridimensional única de proteína-DNA na qual o DNA envolve um conjunto de proteínas (ver Figuras 35-1 e 35-2). Os acentuassomos, uma vez formados, induzem um grande aumento na transcrição do gene do interferon β mediante uma infecção viral. Não é simplesmente a ocupação de proteína dos sítios dos elementos *cis* apostos linearmente que induz a transcrição do gene do interferon β –ao contrário, é a formação do acentuassomo apropriado que fornece superfícies adequadas para o recrutamento de coativadores que resulta na formação acentuada do PIC em um promotor *cis*-ligado e, assim, na ativação da transcrição.

TABELA 38-2 Resumo das propriedades dos intensificadores

• Funcionam quando localizados a longas distâncias do promotor
• Funcionam a montante ou a jusante do promotor
• Funcionam quando orientados em qualquer direção
• Podem funcionar com promotores homólogos ou heterólogos
• Funcionam ligando uma ou mais proteínas
• Funcionam facilitando a ligação do complexo de transcrição basal ao promotor *cis*-ligado
• Funcionam recrutando os complexos correguladores modificadores de cromatina

Os elementos com atuação *cis*, que diminuem ou **reprimem** a expressão de genes específicos, também foram identificados. Como poucos desses elementos foram estudados, não é possível formular generalizações sobre seu mecanismo de ação – embora novamente, como para a ativação do gene, as modificações covalentes no nível da cromatina das histonas e de outras proteínas pelos (repressores)-correpressores das múltiplas subunidades recrutadas, foram implicadas.

A expressão tecidual-específica pode resultar tanto da ação dos intensificadores ou repressores quanto da combinação de ambos os elementos reguladores que atuam de forma *cis*

Muitos genes são agora reconhecidos por abrigar elementos intensificadores ou ativadores em várias localizações em relação às

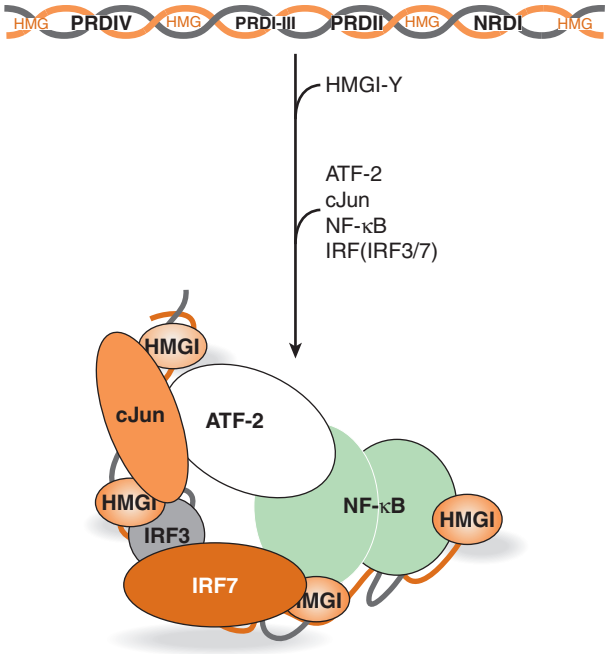


FIGURA 38-11 Formação e estrutura putativa do acentuassomo formado no intensificador do gene humano interferon β. Diagramaticamente representada, na parte de cima se encontra a distribuição dos elementos *cis* múltiplos (HMG, PRDIV, PRDI-III, PRDII, NRDI) que compõem o intensificador do gene interferon β. O intensificador intacto medeia a indução transcricional do gene interferon β (mais de 100 vezes) diante de uma infecção viral em células humanas. Os elementos *cis* desse intensificador modular representam os sítios de ligação para os *trans*-fatores HMG I(Y), cJun-ATF-2, IRF3-IRF7, e NF-κB, respectivamente. Os fatores interagem com esses elementos de DNA de um modo obrigatório, ordenado e altamente cooperativo, como indicado pela seta. A ligação inicial de quatro proteínas HMG I(Y) induz curvas acentuadas do DNA no intensificador, fazendo com que toda a região 70-80 pb assuma um alto nível de curvatura. Esta curvatura é integral à subsequente ligação altamente cooperativa dos outros *trans*-fatores, uma vez que permite que os fatores ligados ao DNA realizem importantes interações diretas proteína-proteína, que tanto contribuem para a formação e estabilidade do acentuassomo quanto geram uma superfície 3D única que serve para recrutar correguladores modificadores de cromatina que realizam atividades enzimáticas (p. ex., Swi/Snf: ATPase, remodeladora de cromatina e P/CAF: histona acetiltransferase) bem como a maquinaria de transcrição geral (RNA-polimerase II e GTF). Embora quatro dos cinco elementos *cis* (PRDIV, PRDI-III, PRDII, NRDI) possam independentemente estimular modestamente (~10 vezes) a transcrição de um gene repórter em células transfectadas (ver Figuraa 38-10 e 38-12), todos os cinco elementos *cis*, em ordem adequada, são necessários para formar um intensificador que possa estimular apropriadamente a transcrição do gene de RNAm (i.e., ≥100 vezes) em resposta à infecção viral de uma célula humana. Essa distinção indica a necessidade estrita da arquitetura apropriada do acentuassomo para uma *trans*-ativação eficiente. Acentuassomos semelhantes, envolvendo distintos fatores *cis* e *trans* e correguladores, devem se formar em muitos outros genes de mamíferos.

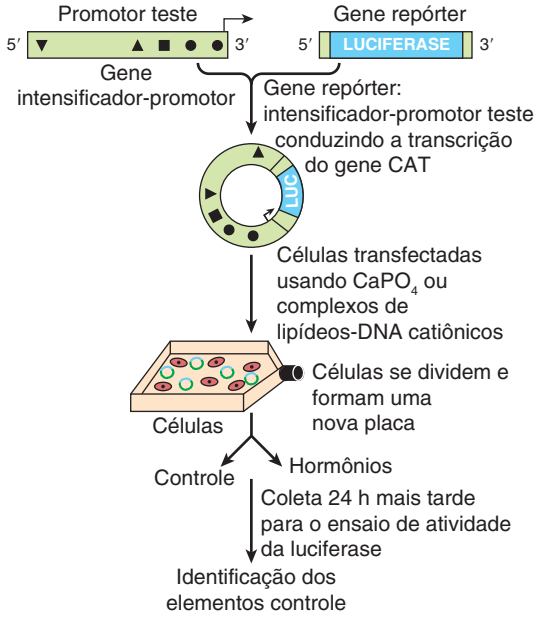


FIGURA 38-12 Uso dos genes repórter para definir os elementos reguladores do DNA. Um fragmento de DNA portando elementos reguladores *cis* (triângulos, quadrado, círculos no diagrama) do gene em questão – neste exemplo, aproximadamente 2 kb de DNA de acompanhamento 5′ e do promotor cognato – é ligado a um vetor de plasmídeo que contém um gene repórter adequado – a enzima luciferase de vagalumes, abreviada LUC. Qualquer que seja o gene repórter usado nesses experimentos, ele não pode estar presente nas células transfectadas. Consequentemente, qualquer detecção dessas atividades em um extrato de células significa que a célula foi transfectada pelo plasmídeo com sucesso. Não é mostrado aqui, mas geralmente se cotransfecta um repórter adicional como a luciferase de *Renilla* para servir como um controle da eficiência de transfecção. As condições de ensaio para as luciferases de vagalumes e *Renilla* são diferentes, portanto, as duas atividades podem ser sequencialmente analisadas pelo uso do mesmo extrato celular. Um aumento da atividade de luciferase de vagalumes em relação ao nível basal, por exemplo, após a adição de um ou mais hormônios, significa que a região de inserção de DNA no plasmídeo do gene repórter contém elementos de resposta hormonal (HRE) funcional. Pedaços progressivamente menores de DNA, regiões com deleções internas ou regiões com mutações pontuais podem ser construídas e inseridas para identificar precisamente o elemento de resposta (ver Figura 38-13 para o mapeamento por deleção dos HRE relevantes).

suas regiões codificadoras. Além de serem capazes de estimular a transcrição gênica, alguns desses elementos intensificadores claramente possuem a capacidade de fazê-lo de um modo específico para cada tecido. Assim, o elemento intensificador associado aos genes de imunoglobulinas entre as regiões J e C, estimula a expressão daqueles genes, preferencialmente em células linfoides. Do mesmo modo, fusionando intensificadores específicos de tecidos, conhecidos ou suspeitos, aos genes repórteres (ver a seguir), e introduzindo esses produtos estimulador-repórter microcirurgicamente em uma única célula embrionária, pode-se criar um animal transgênico (ver Capítulo 39) e rigorosamente testar se um suposto intensificador realmente conduz a expressão em uma célula ou tecido de modo específico. Essa abordagem do **animal transgênico** tem-se revelado útil no estudo da expressão gênica específica de tecidos.

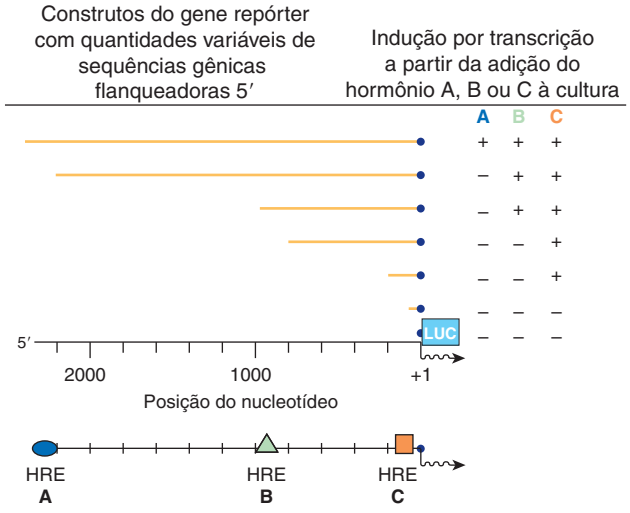


FIGURA 38-13 Mapeamento dos elementos de resposta hormonal (HREs) (A), (B) e (C) usando a abordagem de transfecção do gene repórter. Uma família de genes repórter, construída como descrito na Figura 38-10, pode ser transfectada individualmente para uma célula receptora. Analisando quando certas respostas hormonais são perdidas em comparação ao ponto final de deleção 5′, elementos de resposta hormonal específicos podem ser localizados.

Os genes repórteres são usados para definir intensificadores e outros elementos reguladores

Ligando-se regiões de DNA suspeitas de abrigar sequências reguladoras para vários genes repórter (a **abordagem gênica repórter** ou **química**) **(Figuras 38-10, 38-12 e 38-13)**, pode-se determinar quais regiões nas proximidades dos genes estruturais possuem uma influência na sua expressão. Partes do DNA que supostamente abrigam elementos reguladores são ligadas a um gene repórter adequado e introduzidas em uma célula hospedeira (Figura 38-12). A expressão basal do gene repórter aumentará se o DNA possuir um intensificador. A adição de um hormônio ou metal pesado no meio de cultura aumentará a expressão do gene repórter se o DNA possuir um elemento de resposta hormonal ou de metal (Figura 38-13). A localização precisa do elemento pode ser identificada pela utilização de peças progressivamente mais curtas de DNA, por deleções ou por mutações pontuais (Figura 38-13).

Essa estratégia, utilizando geralmente **células transfectadas em cultura** (i.e., células induzidas a incorporar DNAs exógenos), levou à identificação de centenas de intensificadores, repressores, elementos específicos dos tecidos e elementos de resposta a hormônios, metais pesados e medicamentos. A atividade de um gene em qualquer momento reflete a interação desses numerosos elementos de DNA que atuam como *cis* com seus respectivos fatores de atuação *trans*. Em geral, a resposta transcricional é determinada pelo equilíbrio entre sinalização positiva e negativa para a maquinaria de transcrição. O desafio agora é solucionar como isso ocorre no nível molecular.

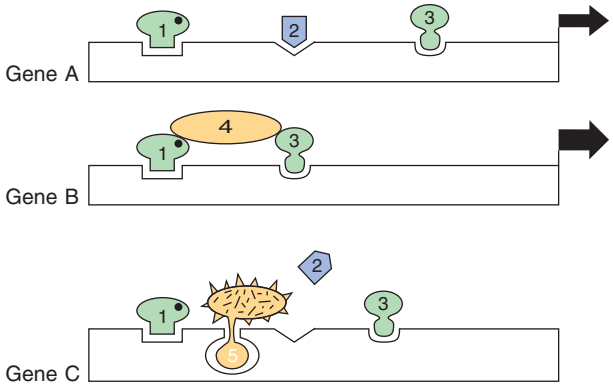


FIGURA 38-14 Combinações de elementos de DNA e proteínas fornecem diversidade na resposta de um gene. O gene A é ativado (a largura da seta indica o grau) pela combinação das proteínas ativadoras transcricionais 1, 2 e 3 (provavelmente com coativadores, como mostrado na Figura 36-10). O gene B é ativado, neste caso mais efetivamente, pela combinação de um, três e quatro; observe que o fator de transcrição 4 não entra em contato com o DNA diretamente neste exemplo. Os ativadores poderiam formar uma ponte linear que liga a maquinaria basal ao promotor ou isto poderia ser realizado pela saída do DNA. Em qualquer caso, o propósito é o de direcionar a maquinaria de transcrição basal para o promotor. O gene C é inativado pela combinação dos fatores de transcrição 1, 5 e 3. Neste caso, evidencia-se que o fator 5 impede a ligação essencial do fator 2 ao DNA, como ocorre no exemplo A. Se o ativador 1 ajuda o repressor 5 a se ligar e se a ligação do ativador 1 precisa de um ligante (ponto cheio), pode-se ver como o ligante poderia ativar um gene em uma célula (gene A) e reprimir outro (gene C) na mesma célula.

Combinações dos elementos de DNA e proteínas associadas fornecem diversidade nas respostas

Genes de procariotos são frequentemente regulados de modo liga/desliga (*on/off*) em resposta a estímulos ambientais simples. Alguns genes de eucariotos são regulados no modo simples liga/desliga, mas o processo na maioria dos genes, especialmente em mamíferos, é muito mais complicado. Sinais que representam vários estímulos ambientais complexos podem convergir para um único gene. A resposta do gene a esses sinais pode ter várias características fisiológicas. Primeiro, a resposta pode variar consideravelmente. Isso é conseguido por meio de respostas positivas aditivas e sinérgicas contrabalançadas por efeitos negativos ou repressores. Em alguns casos, tanto as respostas positivas quanto negativas podem ser dominantes. Também é necessário um mecanismo em que um efetor, como um hormônio, pode ativar um pequeno número de genes em uma célula enquanto reprime alguns, deixando ainda outros sem serem afetados. Quando todos esses processos são acoplados a elementos de fatores específicos de tecidos, uma flexibilidade considerável é obtida. Essas variáveis fisiológicas obviamente necessitam de um arranjo muito mais complicado do que o de um interruptor liga/desliga. A sequência de elementos de DNA em um promotor especifica – com fatores associados – como determinado gene responderá e por quanto tempo uma resposta particular é mantida. Alguns exemplos simples são ilustrados na Figura 38-14.

Os domínios de transcrição podem ser definidos por regiões de controle do *locus* e isoladores

O grande número de genes em células eucarióticas e o conjunto complexo de fatores reguladores da transcrição representam um problema organizacional. Por que alguns genes estão disponíveis para a transcrição em uma determinada célula, enquanto outros não estão? Se os intensificadores podem regular vários genes a dezenas de quilobases de distância e não são dependentes de posição ou orientação, como eles são impedidos de desencadear a transcrição de todos os genes *cis*-ligados próximos? Parte da solução desses problemas é obtida tendo a cromatina disposta em unidades funcionais que restringem os padrões de expressão gênica. Isso pode ser obtido porque a cromatina forma uma estrutura com a matriz nuclear ou outra entidade física ou compartimento no interior do núcleo. Alternativamente, algumas regiões são controladas por elementos de DNA complexos chamados de **regiões de controle do *locus* (LCR)**. Um LCR – com proteínas ligadas associadas – controla a expressão de um grupo de genes. O LCR melhor compreendido regula a expressão da família do gene da globina sobre uma grande região do DNA. Outro mecanismo é fornecido pelos **isoladores**. Esses elementos de DNA, também em associação a uma ou mais proteínas, impedem um intensificador de atuar sobre um promotor, do outro lado de um isolador, em outro domínio de transcrição. Os isoladores, portanto, servem como **elementos transcricionais periféricos**.

VÁRIOS MOTIVOS COMPÕEM OS DOMÍNIOS DE LIGAÇÃO DO DNA DE PROTEÍNAS DE FATORES REGULADORES DA TRANSCRIÇÃO

A especificidade envolvida no controle da transcrição requer que as proteínas reguladoras se liguem com grande afinidade e especificidade à região correta do DNA. Três motivos (*motifs*) especiais – a **hélice–volta–hélice**, o **dedo de zinco** e o **zíper de leucina** – explicam muitas dessas interações proteína–DNA específicas. Exemplos de proteínas que contêm essas formas são apresentados na **Tabela 38-3**.

A comparação das atividades de ligação das proteínas que contêm esses motivos leva a várias generalizações importantes.

1. A ligação deve ser de alta afinidade ao sítio específico e de baixa afinidade a outro DNA.
2. Pequenas regiões da proteína fazem contato direto com o DNA; o resto da proteína, além de fornecer os domínios de ativação *trans*, pode estar envolvido na dimerização de monômeros da proteína de ligação, pode proporcionar uma superfície de contato para a formação de heterodímeros, pode fornecer um ou mais sítios de ligação–ligante ou pode oferecer superfícies para a interação com coativadores ou correpressores.
3. As interações proteína–DNA são mantidas por pontes de hidrogênio, pontes salinas e forças de van der Waals.

TABELA 38-3 Exemplos de fatores de transcrição que contêm vários motivos de ligação do DNA

Motivo de ligação	Organismo	Proteína reguladora
Hélice–volta–hélice	*E. coli* Fago Mamíferos	CAP repressor do lac Repressores λcI, cro e 434 Proteínas homeobox Pit-1, Oct1, Oct2
Dedo de zinco	*E. coli a* Levedura *Drosophila* *Xenopus* Mamíferos	Proteína do gene 32 Gal4 *Serendipity, Hunchback* TFIIIA Família do receptor esteroide, Sp1
Zíper de leucina	Levedura Mamíferos	GCN4 C/EBP, fos, Jun, Fra-1, proteína de ligação CRE, c-*myc*, n-*myc*, l-*myc*

4. Os motivos encontrados nessas proteínas são especiais; sua presença em uma proteína de função desconhecida sugere que a proteína pode se ligar ao DNA.
5. As proteínas com motivos hélice–volta–hélice ou zíper de leucina formam dímeros, e seus respectivos sítios de ligação do DNA são palíndromos simétricos. Em proteínas com o motivo dedo de zinco, o sítio de ligação é repetido de duas a nove vezes. Essas características permitem interações cooperativas entre os sítios de ligação e estimulam o grau e a afinidade da ligação.

O motivo hélice–volta–hélice

O primeiro motivo descrito foi a **hélice–volta–hélice**. A análise da estrutura 3D do regulador de transcrição lambda Cro revelou que cada monômero é composto por três folhas β antiparalelas e três hélices α **(Figura 38-15)**. O dímero se forma pela associação de folhas β_3 antiparalelas. As hélices α_3 formam a superfície de reconhecimento do DNA, e o resto da molécula parece estar envolvido na estabilização dessas estruturas. O diâmetro médio de uma hélice α é de 1,2 nm, que é aproximadamente a largura da cavidade maior na forma B do DNA.

O domínio de reconhecimento do DNA de cada monômero Cro interage com 5 pb e os sítios de ligação do dímero abrangem 3,4 nm, permitindo o ajuste em meias-voltas sucessivas da cavidade maior na mesma superfície (Figura 38-15). Análises de raios X do repressor λ cI, CAP (a proteína receptora de AMPc de *E. coli*), o repressor triptofano e o repressor fago 434 também mostram essa estrutura dimérica hélice–volta–hélice que está presente igualmente em proteínas de ligação do DNA de eucariotos (ver Tabela 38-3).

O motivo dedo de zinco

O **dedo de zinco** foi o segundo motivo de ligação do DNA a ter sua estrutura atômica elucidada. Sabia-se que a proteína TFIIIA, um regulador positivo da transcrição do gene RNA 5S, necessitava de zinco para a sua atividade. Análises estruturais e biofísicas revelaram que cada molécula de TFIIIA contém nove íons de

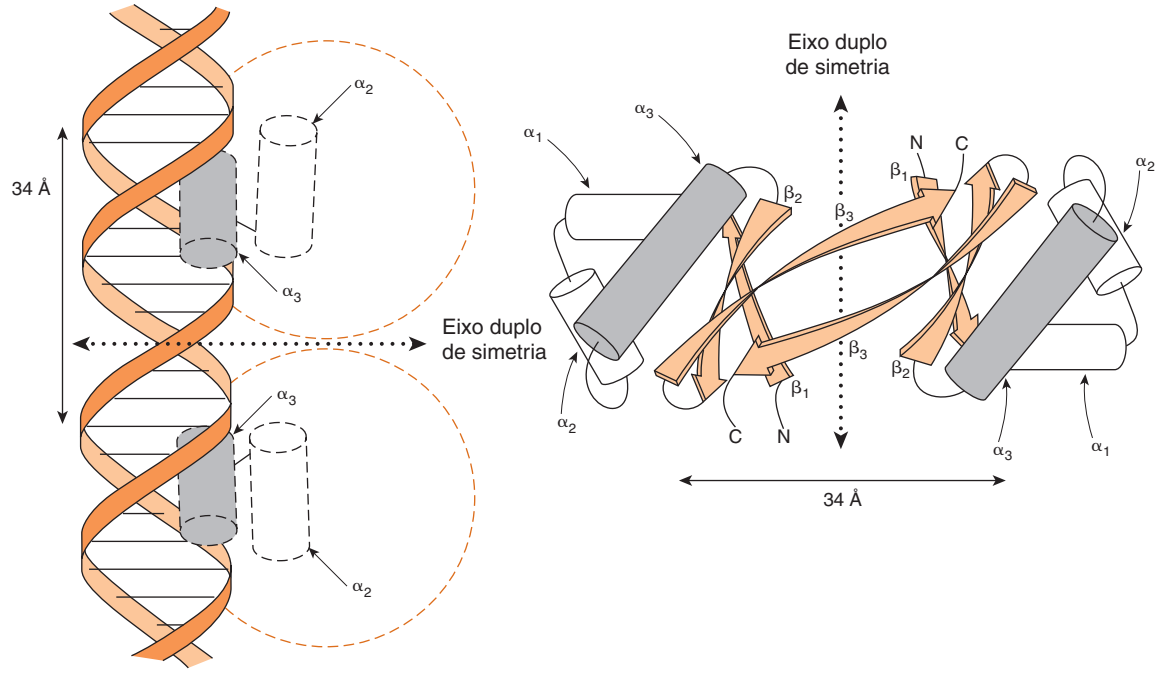


FIGURA 38-15 Uma representação esquemática da estrutura 3D da proteína Cro e sua ligação ao DNA pelo motivo hélice–volta–hélice (esquerda). O monômero Cro consiste em três folhas β antiparalelas (β_1 a β_3) e três hélices α (α_1 a α_3). O motivo hélice–volta–hélice é formado porque as hélices α_3 e α_2 são mantidas em cerca de 90º uma em relação à outra por uma volta de quatro aminoácidos. A hélice α_3 do Cro é a superfície de reconhecimento do DNA (**sombreado**). Dois monômeros se associam por folhas β_3 para formar um dímero que tem um eixo duplo de simetria (**direita**). Um dímero Cro se liga ao DNA por meio de suas hélices α_3, cada uma das quais contacta 5 pb na mesma superfície da cavidade maior (ver Figura 38-6). A distância entre pontos comparáveis nas duas hélices α de DNA é de 34 Å, que é a distância requerida para uma volta completa da dupla-hélice (Cortesia de B Mathews).

zinco em um complexo de coordenação repetido formado por resíduos de cisteína–cisteína rigorosamente espaçados, seguidos de 12 a 13 aminoácidos e depois por um par histidina-histidina (**Figura 38-16**). Em alguns casos – principalmente a família do receptor hormonal nuclear esteroide–tireoide, esse par His-His é substituído por um segundo par Cys–Cys. A proteína que contém os dedos de zinco parece repousar sobre uma face da hélice de DNA, com dedos sucessivos posicionados alternativamente em uma volta da cavidade maior. Como é o caso do domínio de reconhecimento na proteína hélice–volta–hélice, cada dedo de zinco TFIIIA contacta cerca de 5 pb de DNA. A importância desse motivo na ação dos hormônios esteroides é ressaltada por um "experimento da natureza". A mutação de um único aminoácido em qualquer dos dois dedos de zinco da proteína receptora $1,25(OH)_2$-D_3 resulta em resistência à ação desse hormônio e na síndrome clínica do raquitismo.

O motivo zíper de leucina

A análise cuidadosa de uma sequência de 30 aminoácidos na região do terminal carboxila da proteína de ligação intensificadora C/EBP revelou uma nova estrutura, o **motivo do zíper de leucina**. Como ilustrado na **Figura 38-17**, essa região da proteína forma uma hélice α na qual há uma repetição periódica dos resíduos de leucina a cada sete posições. Isso ocorre para oito voltas helicais e quatro repetições de leucina. Estruturas semelhantes foram encontradas em várias outras proteínas associadas à regulação da transcrição em células de mamíferos e leveduras. Essa estrutura permite que dois monômeros idênticos ou não idênticos (p. ex., Jun-Jun ou Fos-Jun) se "fechem em zíper juntos" em uma espiral enrolada e formem um complexo dimérico forte (Figura 38-17). Essa interação proteína–proteína pode servir para intensificar a associação entre os DBDs separados e seus alvos (Figura 38-17).

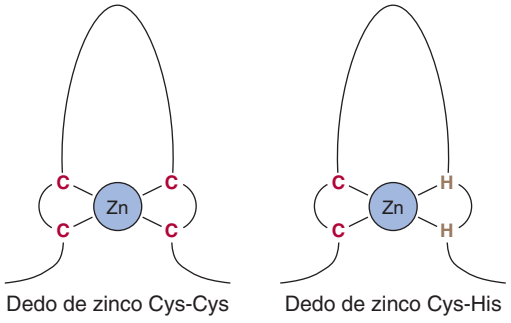


FIGURA 38-16 Os dedos de zinco são uma série de domínios repetidos (dois a nove) na qual cada um se centra em uma coordenação tetraédrica com o zinco. No caso do TFIIIA, a coordenação é fornecida por um par de resíduos de cisteína (C) separado por 12 a 13 aminoácidos de um par de resíduos de histidina (H). Em outras proteínas dedo de zinco, o segundo par também consiste em resíduos C. Os dedos de zinco se ligam na cavidade maior com os dedos adjacentes, entrando em contato com 5 pb ao longo da mesma face da hélice.

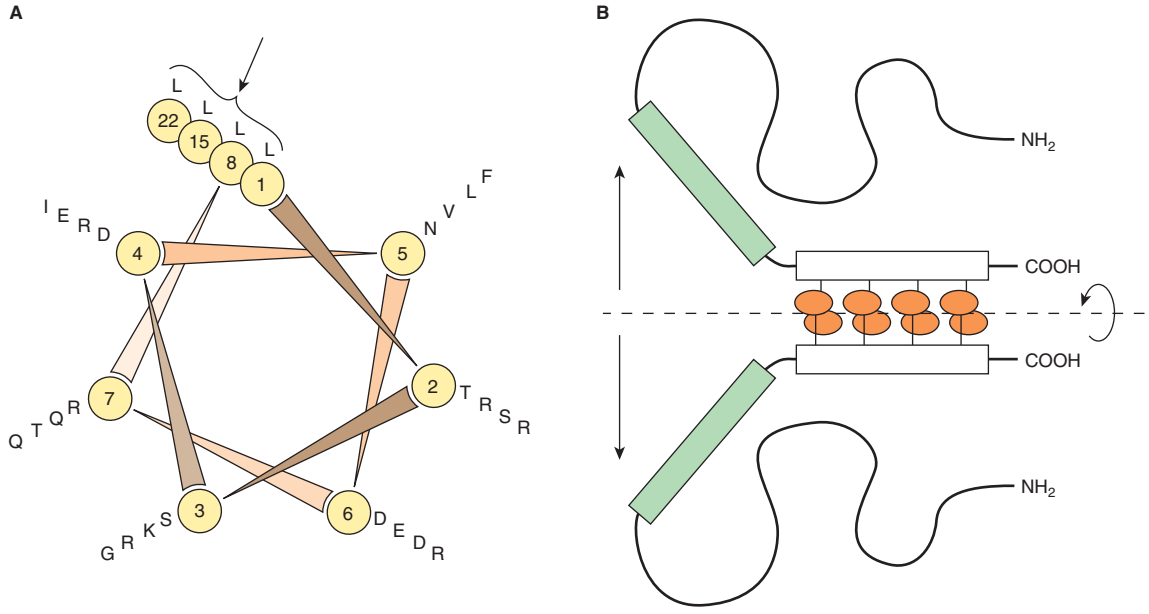


FIGURA 38-17 O motivo do zíper de leucina. (**A**) Mostra uma análise do giro da hélice de uma porção terminal carboxila da proteína de ligação de DNA C/EBP. A sequência do aminoácido é apresentada de uma terminação à outra ao longo do eixo de uma hélice α esquemática. O giro da hélice consiste em sete raios que correspondem a sete aminoácidos que compreendem cada duas voltas da hélice α. Observe que os resíduos de leucina (L) ocorrem a cada sete posições (neste aminoácido esquemático C/EBP nos resíduos 1, 8, 15, 22; ver seta). Outras proteínas com "zíperes de leucina" têm um padrão semelhante de giro de hélice. (**B**) Modelo esquemático do domínio de ligação ao DNA da C/EBP. Duas cadeias polipeptídicas C/EBP idênticas são mantidas na forma de um dímero pelo domínio de zíper de leucina de cada polipeptídeo (indicado pelos retângulos e formas ovais ligadas). Essa associação é necessária para manter os domínios de ligação do DNA de cada polipeptídeo (os retângulos sombreados) na conformação apropriada para a ligação do DNA. (Cortesia de S McKnight.)

A LIGAÇÃO DO DNA E OS DOMÍNIOS DE TRANSATIVAÇÃO DA MAIORIA DAS PROTEÍNAS REGULADORAS SÃO SEPARADOS

A ligação do DNA pode resultar em uma mudança da conformação geral que permite à proteína ligada ativar a transcrição, ou essas duas funções podem ser servidas por domínios separados e independentes. Experimentos de troca de domínios sugerem que essa última é geralmente a que ocorre.

O produto do gene *GAL1* está envolvido no metabolismo da galactose em leveduras. A transcrição desse gene é regulada positivamente pela proteína GAL4, que se liga a uma sequência ativadora a montante (UAS), ou intensificador, por um domínio aminoterminal. O DBD de 73 aminoácidos aminoterminal de GAL4 foi removido e substituído pelo DBD de LexA, uma proteína de ligação de DNA da *E. coli*. Essa troca de domínio resultou em uma molécula que não se ligou ao UAS *GAL1* e, é claro, não ativou o gene *GAL1* (**Figura 38-18**). Se, no entanto, o operador *lexA* – a sequência de DNA normalmente ligada pelo DBD *lexA* – fosse inserido na região promotora do gene *GAL*, substituindo, assim, o estimulador *GAL1* normal, a proteína híbrida ligada a esse promotor (no operador *lexA*) ativaria a transcrição de *GAL1*. Esse experimento, que foi repetido inúmeras vezes, confere uma sólida evidência de que a região terminal carboxila de GAL4 leva à ativação transcricional. Esses dados também demonstram que o DBD e os domínios de transativação (ADs) são independentes e não interativos. A hierarquia envolvida na montagem dos complexos gênicos de transcrição–ativação incluem proteínas que se ligam ao DNA e fazem a transativação; outras que formam complexos proteína–proteína que ligam proteínas de ligação ao DNA às proteínas transativadoras; e outras que formam complexos proteína–proteína com componentes de correguladores do aparato de transcrição basal. Uma determinada proteína pode, portanto, ter várias superfícies modulares ou domínios que servem a diferentes funções (ver **Figura 38-19**). Como descrito no Capítulo 36, o objetivo principal desses conjuntos complexos é facilitar a montagem e/ou atividade do aparato de transcrição basal do promotor *cis*-ligado.

A REGULAÇÃO GÊNICA EM PROCARIOTOS E EUCARIOTOS DIFERE EM ASPECTOS IMPORTANTES

Além da transcrição, as células eucarióticas empregam vários mecanismos para regular a expressão gênica (**Tabela 38-4**). A membrana nuclear das células eucarióticas fisicamente separa a transcrição da tradução do gene, uma vez que os ribossomos existem apenas no citoplasma. Um maior número de etapas, especialmente no processamento do RNA, está mais envolvido na expressão dos genes de eucariotos do que na dos genes de procariotos, e essas etapas fornecem sítios adicionais para influências reguladoras que não existem em procariotos. Essas etapas de processamento do RNA em eucariotos, descritas em detalhe no

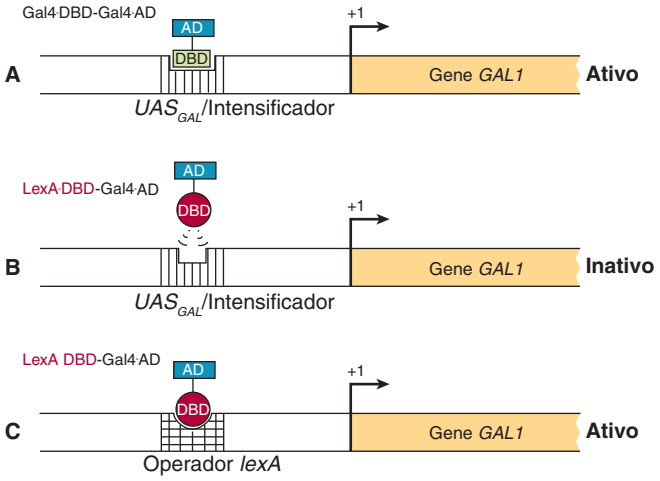


FIGURA 38-18 Experimentos de troca de domínios demonstram a natureza independente da ligação ao DNA e dos domínios de ativação de transcrição. O promotor do gene *GAL1* contém uma sequência de ativação (UAS) molécula a montante, ou intensificador, que está ligado ao fator regulador de transcrição GAL4 (**A**). O GAL4, como a proteína λ cI, é modular e contém um DBD N-terminal e um domínio de ativação C-terminal, ou AD. Quando o fator de transcrição GAL4 se liga ao intensificador *GAL1*/UAS, a ativação da transcrição do gene *GAL1* ocorre (Ativo). Uma proteína quimérica, na qual o domínio aminoterminal ligado ao DNA (DBD) de GAL4 é removido e substituído pelo DBD da proteína LexA de *E. coli* (LexA DBD-GAL4 AD), não é capaz de estimular a transcrição de *GAL1*, pois a LexA DBD não consegue se ligar ao intensificador GAL1/UAS (**B**) Inversamente, a proteína de fusão LexA DBD–GAL4 AD aumenta a transcrição de *GAL1* quando o operador *lexA* (o alvo natural do DBD LexA) é inserido na região promotora de *GAL1* (**C**) substituindo o *GAL1* UAS normal.

Capítulo 36, incluem o capuz da extremidade 5′ dos transcritos primários, a adição de uma cauda de poliadenilato à extremidade 3′ dos transcritos e a excisão das regiões de íntrons para gerar éxons unidos em uma molécula de mRNA madura. Até a presente data, as análises da expressão gênica de eucariotos fornecem evidências de que a regulação ocorre no nível da **transcrição,** do **processamento nuclear do RNA,** da **estabilidade do mRNA e** da **tradução**. Além disso, a amplificação e o rearranjo influenciam a expressão gênica.

Devido ao advento da tecnologia do DNA recombinante, muito progresso foi feito recentemente na compreensão da expressão gênica de eucariotos. Entretanto, como a maioria dos eucariotos contém muito mais informação genética do que os procariotos, e como a manipulação desses genes é muito mais difícil, os aspectos moleculares da regulação gênica de eucariotos são menos bem compreendidos do que os exemplos discutidos anteriormente neste capítulo. Esta seção descreve brevemente alguns tipos diferentes de regulação gênica de eucariotos.

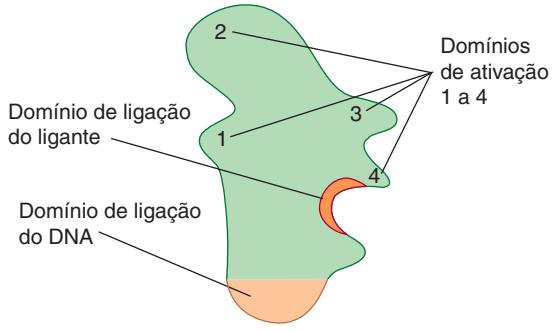


FIGURA 38-19 As proteínas que regulam a transcrição têm vários domínios. Este fator de transcrição hipotético tem um DBD que é distinto de um domínio de ligação do ligante (LBD) e vários domínios de ativação (ADs) (1 a 4). Outras proteínas podem não ter o DBD ou LBD e todas podem ter números variáveis de domínios que contactam outras proteínas, incluindo correguladoras e aquelas do complexo de transcrição basal (ver também Capítulos 41 e 42).

Os miRNAs modulam a expressão gênica pela alteração da função do mRNA

Como observado no Capítulo 35, a descoberta recente da classe de RNA pequenos de eucariotos, denominado de miRNA, contribui de modo importante para o controle da expressão do gene. Esses RNA de aproximadamente 22 nucleotídeos regulam a tradução de mRNAs específicos tanto inibindo a tradução quanto induzindo a degradação de mRNA, embora em alguns poucos casos tenha se observado que os miRNAs estimulam a função do mRNA (tradução). Acredita-se que pelo menos uma parte da modulação dirigida pelo miRNA da atividade do mRNA ocorre no **corpo P** (Figura 37-11). A ação do miRNA pode resultar em sérias alterações na produção de proteínas e, portanto, na expressão gênica. Os miRNAs têm sido implicados em numerosas doenças humanas tais como doenças cardíacas, câncer, perda de massa muscular, infecção viral e diabetes.

Os miRNAs, bem como os fatores de transcrição de ligação ao DNA, descritos em detalhe anteriormente, são *trans*-ativos e, uma vez sintetizados e adequadamente processados, interagem com proteínas específicas e se ligam aos mRNAs alvo, geralmente nas regiões 3′ do mRNA não traduzidas (Figura 36-17). A ligação dos miRNAs aos mRNAs alvos é orientada pelas regras normais de pareamento de bases. Em geral, se o pareamento de bases **miRNA–mRNA** possui um ou mais erros, a tradução do mRNA "alvo" cognato é inibida, enquanto se o **pareamento de bases miRNA–mRNA** é perfeito em todos os 22 nucleotídeos, o mRNA correspondente é degradado.

TABELA 38-4 A Expressão gênica é regulada pela transcrição e por várias outras maneiras no nível do RNA em células eucarióticas

• Amplificação gênica
• Rearranjo gênico
• Processamento de RNA
• *Splicing* alternativo de mRNA
• Transporte do mRNA do núcleo para o citoplasma
• Regulação da estabilidade do mRNA
• Silenciamento e ativação da compartimentalização miRNA/ncRNA

Devido à enorme e sempre crescente importância dos miRNAs, muitos cientistas e empresas de biotecnologia estão ativamente estudando a biogênese, o transporte e a função do miRNA na esperança da cura de doenças humanas. O tempo dirá a magnitude e a universalidade da regulação gênica mediada por miRNA. É provável que, no futuro próximo, os cientistas desvendarão o significado médico desses intrigantes RNAs pequenos.

Os genes de eucariotos podem ser amplificados ou rearranjados durante o desenvolvimento ou em resposta a fármacos

Durante o desenvolvimento inicial dos metazoários, há um aumento abrupto na necessidade de moléculas específicas, tais como as moléculas de RNA ribossomal e de RNA mensageiro para proteínas que formam estruturas como a casca do ovo. Um modo de elevar a taxa em que tais moléculas podem ser formadas é aumentar o número de genes disponíveis para a transcrição dessas moléculas específicas. Entre as sequências de DNA repetitivo no interior do genoma estão centenas de cópias de genes de RNA ribossomal. Esses genes pré-existem repetitivamente no DNA dos gametas e, assim, são transmitidos em um grande número de cópias de geração à geração. Em alguns organismos específicos, tais como a mosca-da-fruta (*Drosophila*), durante a oogênese, ocorre uma amplificação de alguns genes preexistentes, como aqueles das proteínas do córion (casca do ovo). Posteriormente, esses genes amplificados, presumivelmente gerados por um processo de iniciações repetidas durante a síntese do DNA, fornecem múltiplos sítios para a transcrição do gene (**Figuras 36-4** e **38-20**).

Como observado no Capítulo 36, as sequências de codificação responsáveis pela geração de moléculas de proteínas específicas são frequentemente não contíguas no genoma de mamíferos. No caso dos genes codificadores de anticorpos, isso é particularmente verdadeiro. Como descrito em detalhe no Capítulo 50, as imunoglobulinas são compostas por dois polipeptídeos, as chamadas cadeias pesadas (cerca de 50 kDa) e cadeias leves (cerca de 25 kDa). Os mRNAs que codificam essas duas subunidades de proteínas são codificados por sequências gênicas que estão sujeitas a extensas mudanças na sequência de codificação do DNA. Estas mudanças de codificação do DNA são fundamentais para gerar o requisito de diversidade de reconhecimento, central para o funcionamento adequado da imunidade.

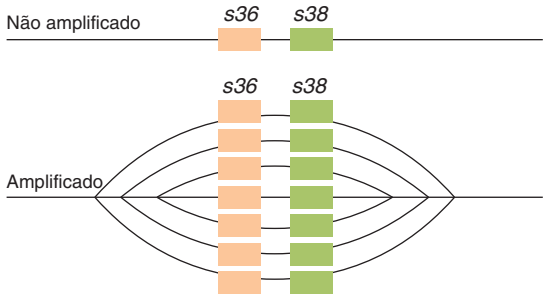


FIGURA 38-20 Representação esquemática da amplificação dos genes *s36* e *s38* das proteínas coriônicas. (Reproduzida com a permissão de Chisholm R: Gene amplification during development. Trends Biochem Sci 1982;7:161. Copyright © 1982. Reimpressa com a permissão de Elsevier).

Os mRNAs de cadeias leve e pesada de IgG são codificados por vários segmentos diferentes que são repetidos em conjunto na linha germinativa. Assim, por exemplo, a cadeia leve de IgG é composta por domínios ou segmentos variáveis (V_L), que se juntam (J_L) e constantes (C_L). Para subconjuntos particulares de cadeias leves de IgG, existem em torno de 300 segmentos que codificam genes V_L, repetidos em conjunto, 5 sequências codificadoras de J_L arranjadas em conjunto e cerca de 10 segmentos que codificam genes C_L. Todas essas múltiplas regiões codificadoras distintas estão localizadas na mesma região do mesmo cromossomo, e cada tipo de segmento codificador (V_L, J_L e C_L) é repetido em conjunto, de um modo cabeça-cauda, no interior da região de repetição do segmento. Tendo múltiplos segmentos de V_L, J_L e C_L para escolher, uma célula imune possui o maior repertório de sequências para trabalhar a fim de desenvolver tanto a flexibilidade quanto a especificidade imunológica. Entretanto, uma determinada unidade de transcrição de cadeia leve de IgG funcional – como todas a outras unidades de transcrição "normais" de mamíferos – contém apenas as sequências codificadoras para uma única proteína. Portanto, antes que uma cadeia leve de IgG específica possa ser expressa, as sequências codificadoras individuais de V_L, J_L e C_L devem ser recombinadas para gerar uma unidade de transcrição única e contígua que exclui os múltiplos segmentos não utilizados (i.e., os aproximadamente 300 segmentos V_L não usados, os 4 segmentos J_L não usados e os 9 segmentos C_L não usados). Essa deleção da informação genética não usada é realizada pela recombinação seletiva do DNA que remove o DNA codificador indesejado enquanto retém as sequências codificadoras necessárias: uma sequência V_L, uma J_L e uma C_L (as sequências V_L são submetidas a pontos adicionais de mutagênese, para gerar ainda maior variabilidade – daí o seu nome). As sequências recém-recombinadas formam, assim, uma única unidade de transcrição que é responsável pela transcrição mediada pela RNA-polimerase II em um único mRNA monocistrônico. Embora os genes de IgG representem um dos casos mais bem estudados de rearranjo de DNA direcionado pela modulação da expressão gênica, outros casos de rearranjo do DNA regulado por genes foram descritos na literatura. De fato, como detalhado a seguir, a amplificação gênica induzida por medicamentos é uma complicação importante da quimioterapia do câncer.

Recentemente, tem sido possível promover a amplificação de regiões genéticas específicas em culturas de células de mamíferos. Em alguns casos, um aumento de 1.000 vezes no número de cópias de genes específicos pode ser alcançado em um período de tempo que envolve doses crescentes de medicamentos seletivos. De fato, foi demonstrado em pacientes recebendo metotrexato para o câncer que as células malignas podem desenvolver **resistência ao fármaco**, aumentando o número de genes para a di-hidrofolato redutase, o alvo do metotrexato. Eventos de amplificação e deleção gênica que envolvem de 10 a 1 milhão de pb de DNA como esses ocorrem espontaneamente *in vivo* – i.e., na ausência de agentes seletivos fornecidos exogenamente – e essas rodadas extras não programadas de replicação podem se tornar estabilizadas no genoma sob pressões seletivas adequadas.

O processamento do RNA alternativo é outro mecanismo de controle

Além de afetar a eficiência de utilização do promotor, as células eucarióticas empregam o processamento do RNA alternativo para controlar a expressão gênica. Isto pode ocorrer quando promotores alternativos, sítios de união íntron-éxon ou sítios de poliadenilação são utilizados. Ocasionalmente, ocorre a heterogeneidade no interior de uma célula, mas é mais comum o mesmo transcrito primário ser processado diferentemente em tecidos distintos. Alguns exemplos de cada um desses tipos de regulação são apresentados a seguir.

O uso de **sítios de início de transcrição alternativa** resulta em um éxon 5′ diferente em mRNA codificando a amilase e a cadeia leve de miosina em camundongos, glicoquinase em ratos e álcool desidrogenase e actina em drosófila. Os **sítios de poliadenilação alternativa** do transcrito primário da cadeia pesada de imunoglobulina μ resultam em mRNAs que podem ter 2.700 bases de comprimento (μ_m) ou 2.400 bases de comprimento (μ_s). Isto resulta em uma região terminal carboxila diferente das proteínas codificadas de tal forma que a proteína μ_m permanece ligada à membrana do linfócito B e a imunoglobulina μ_sé secretada. O ***splicing* e processamento alternativos** resultam na formação de sete mRNAs únicos de α tropomiosina em sete tecidos diferentes. Não está claro como essas decisões de *splicing* e processamento são feitas ou se essas etapas podem ser reguladas.

A regulação da estabilidade do RNA mensageiro fornece outro mecanismo de controle

Embora a maioria dos mRNAs em células de mamíferos seja muito estável (meias-vidas medidas em horas), alguns são repostos muito rapidamente (meias-vidas de 10 a 30 minutos). Em certos casos, a estabilidade do mRNA está sujeita à regulação. Isto tem importantes implicações, uma vez que há geralmente uma relação direta entre a quantidade de mRNA e a tradução deste mRNA em sua proteína cognata. Mudanças na estabilidade de um mRNA específico podem, portanto, ter efeitos importantes em processos biológicos.

Os RNAs mensageiros existem no citoplasma como partículas de ribonucleoproteínas (RNP). Algumas destas proteínas protegem o mRNA da digestão por nucleases, enquanto outras podem, sob certas condições, promover o ataque de nucleases. Acredita-se que os mRNAs são estabilizados ou desestabilizados pela interação de proteínas com essas várias estruturas ou sequências. Certos efetores, tais como hormônios, podem regular a estabilidade do mRNA aumentando ou diminuindo a quantidade dessas proteínas.

Parece que **as extremidades das moléculas de mRNA estão envolvidas na estabilidade do mRNA (Figura 38-21)**. A estrutura do capuz 5′ (5′*cap*) no mRNA de eucariotos impede o ataque de exonucleases 3′. Em moléculas de mRNA com tais estruturas, presume-se que um único corte endonucleolítico permita às exonucleases atacar e digerir a molécula inteira. Outras estruturas (sequências) na região não traduzida 5′ (5′ UTR), a região codificadora, e os 3′UTR promovem ou impedem essa ação endonucleolítica inicial (Figura 38-21). Alguns exemplos ilustrativos serão citados.

A deleção do 5′UTR resulta em um prolongamento de três a cinco vezes da meia-vida do mRNA do c-*myc*. O encurtamento da região codificadora do mRNA de histona resulta em uma meia-vida prolongada. Uma forma de autorregulação da estabilidade do mRNA indiretamente envolve a região codificadora. A tubulina livre se liga aos primeiros quatro aminoácidos de uma cadeia nascente de tubulina assim que ela emerge do ribossomo. Isto parece ativar uma RNase associada ao ribossomo que, então, digere o mRNA da tubulina.

As estruturas na extremidade 3′, incluindo a cauda poli(A), estimulam ou diminuem a estabilidade de mRNAs específicos. A ausência de uma cauda poli(A) está associada a uma rápida degradação do mRNA e a remoção de poli(A) de alguns RNAs resulta em sua desestabilização. Os mRNAs de histonas não possuem a cauda poli(A), mas têm uma sequência próxima ao terminal 3′ que pode formar uma estrutura em grampo, e isto parece conferir resistência ao ataque exonucleolítico. O mRNA de histona H4, por exemplo, é degradado na direção 3′–5′, mas apenas após ocorrer um único corte endonucleolítico cerca de nove nucleotídeos de distância da extremidade 3′, na região da estrutura em grampo putativa. As estruturas em grampo na sequência não codificadora 3′ também são críticas para a regulação, pelo ferro, do mRNA que codifica o receptor de transferrina. As estruturas em grampo também estão associadas à estabilidade do mRNA em bactérias, sugerindo que esse mecanismo possa ser comumente empregado.

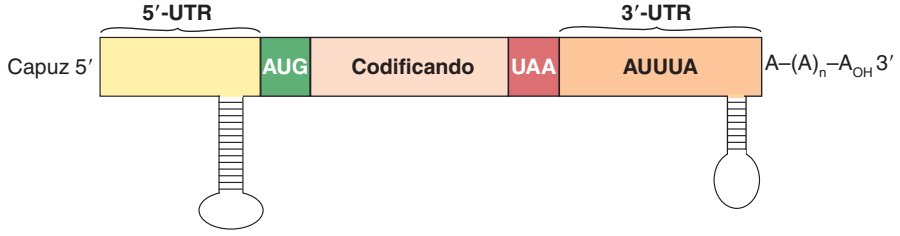


FIGURA 38-21 Estrutura de um mRNA eucariótico típico mostrando elementos que estão envolvidos na regulação da estabilidade do mRNA. O típico mRNA eucariótico tem uma sequência não codificadora 5′, ou região não traduzida (5′ UTR), uma região codificadora e uma região 3′ não traduzida (3′UTR). Essencialmente, todos os mRNAs são revestidos na terminação 5′ e maioria tem uma sequência poliadenilada de 100 a 200 nucleotídeos de comprimento na sua terminação 3′. A cobertura 5′ e a cauda poli(A) 3′ protegem o mRNA contra o ataque de exonucleases e estão ligadas a proteínas específicas que interagem para facilitar a tradução (ver Figura 37-7). Estruturas em forma de grampo nas NCS 5′ e 3′ e a região rica em AU nas NCS 3′ representam os sítios de ligação para proteínas específicas que modulam a estabilidade do mRNA. Os miRNA geralmente têm como alvo sequências na 3′UTR.

Outras sequências nas terminações 3′ de certos mRNAs de eucariotos parecem estar envolvidos na desestabilização dessas moléculas, sendo parte mediada pela ação de miRNA específicos, como discutido anteriormente. Além disso, particularmente interessantes são as regiões ricas em AU, muitas das quais contêm a sequência AUUUA. Esta sequência aparece em mRNA que têm uma meia-vida muito curta, incluindo alguns oncogenes codificadores de proteínas e citocinas. A importância dessa região é destacada por um experimento em que uma sequência correspondente ao UTR 3′ do mRNA do fator estimulador de colônia (CSF) de meia-vida curta, que contém o motivo AUUUA, foi adicionado à terminação 3′ do mRNA da β-globina. Em vez de se tornar muito estável, esse mRNA híbrido de β-globina agora tinha a meia-vida curta característica do mRNA CSF. A maior parte desse metabolismo do mRNA provavelmente ocorre em corpos P citoplasmáticos.

A partir dos poucos exemplos citados, fica evidente que vários mecanismos são usados para regular a estabilidade do mRNA e, portanto, funcionam – assim como vários mecanismos são usados para regular a síntese de mRNA. A regulação coordenada desses dois processos confere à célula uma extraordinária adaptabilidade.

RESUMO

- As constituições genéticas das células somáticas de metazoários são aproximadamente idênticas.
- O fenótipo (especificidade tecidual ou celular) é determinado por diferenças na expressão gênica desse complemento de genes.
- Alterações na expressão gênica permitem a uma célula se adaptar às mudanças ambientais, aos estímulos de desenvolvimento e a sinais fisiológicos.
- A expressão gênica pode ser controlada em níveis múltiplos por mudanças na transcrição, no processamento de RNA, na localização e na estabilidade ou utilização. A amplificação gênica e rearranjos também influenciam a expressão gênica.
- Controles de transcrição operam no nível das interações proteína–DNA e proteína–proteína. Essas interações apresentam modularidade do domínio proteico e alta especificidade.
- Várias classes diferentes de domínios de ligação de DNA foram identificadas em fatores de transcrição.
- Modificações da cromatina e do DNA contribuem de modo importante para o controle da transcrição eucariótico, modulando a acessibilidade do DNA e especificando o recrutamento de coativadores e correpressores específicos para os genes alvo.
- Vários mecanismos epigenéticos para o controle gênico foram descritos, e os mecanismos moleculares pelos quais esses processos operam estão começando a ser elucidados no nível molecular.
- Os miRNAs e siRNAs modulam a tradução e estabilidade do mRNA; esses mecanismos complementam os controles de transcrição para regular a expressão gênica.

REFERÊNCIAS

Bhaumik SR, Smith E, Shilatifard A, et al: Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. Nat Struct Mol Biol 2007;14;1008.

Bird AP, Wolffe AP: Methylation-induced repression—belts, braces and chromatin. Cell 1999;99:451.

Bonasio R, Tu S, Reinberg D: Molecular signals of epigenetic states. Science 2010;330:612–616.

Busby S, Ebright RH: Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. Cell 1994;79:743.

Gerstein MB, Lu ZJ, Van Nostrand EL, et al: Integrative analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome by the modENCODE project. Science 2010;330:1775–1787.

Jacob F, Monod J: Genetic regulatory mechanisms in protein synthesis. J Mol Biol 1961;3:318.

Klug A: The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. Annu Rev Biochem 2010;79:213–231.

Lemon B, Tjian R: Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. Genes Dev 2000; 14:2551.

Letchman DS: Transcription factor mutations and disease. N Engl J Med 1996;334:28.

Margueron R, Reinberg D: The polycomb complex PRC2 and its mark in life. Nature 2011;469:343–349.

Näär AM, Lemon BD, Tjian R: Transcriptional coactivator complexes. Annu Rev Biochem 2001;70:475.

Nabel CS, Kohli RM: Demystifying DNA Demethylation Science 2011; 333:1229–1230.

Oltz EM: Regulation of antigen receptor gene assembly in lymphocytes. Immunol Res 2001;23:121.

Ørom UA, Derrien T, Beringer M, et al: Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells. Cell 2010;143:46–58.

Ptashne M: *A Genetic Switch,* 2nd ed. Cell Press and Blackwell Scientific Publications, 1992.

Roeder RG: Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. FEBS Lett 2005;579:909.

Ruthenburg AJ, Li H, Patel DJ, et al: Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding molecules. Nature Rev Mol Cell Bio 2007;8:983.

Segal E, Fondufe-Mittendorf Y, Chen L, et al: A genomic code for nucleosome positioning. Nature 2006;442:772.

Small EM, Olson EN: Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. Nature 2011;469:336–342.

The modENCODE Consortium, Roy S, Ernst J, Kharchenko PV, et al: Identification of functional elements and regulatory circuits by Drosophila modENCODE. Science 2010;330,1787–1797.

Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, et al: Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. Genes Dev 2006;20:515.

Yang XJ, Seto E: HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. Oncogene 2007;26:5310.

Weake VM, Workman JL: Inducible gene expression: diverse regulatory mechanisms. Nat Rev Genet 2010;11:426–437.

Wu R, Bahl CP, Narang SA: Lactose operator-repressor interaction. Curr Top Cell Regul 1978;13:137.

Zhang Z, Pugh BF: High-resolution genome-wide mapping of the primary structure of chromatin. Cell 2011;144:175-186.

Genética Molecular, DNA Recombinante e Tecnologia Genômica

CAPÍTULO 39

P. Anthony Weil, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Explicar os procedimentos básicos e métodos envolvidos na tecnologia do DNA recombinante e engenharia genética.
- Reconhecer a base lógica utilizada para sintetizar, analisar e sequenciar o DNA e o RNA.
- Demonstrar como identificar e quantificar proteínas individuais, tanto solúveis quanto insolúveis (i.e., ligadas à membrana ou compartimentalizadas intracelularmente), bem como as proteínas ligadas a sequências específicas do DNA e RNA genômicos.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA*

O desenvolvimento do DNA recombinante, dos microarranjos (*microarrays*) de DNA de alta densidade, *screening*, as análises em escala genômica de baixo custo, o sequenciamento de DNA e outras metodologias de genética molecular revolucionaram a biologia e têm apresentado um impacto crescente na medicina clínica. Embora se tenha aprendido muito sobre as doenças genéticas humanas por meio da análise genealógica e do estudo das proteínas afetadas, em muitos casos em que o defeito genético é desconhecido, essas abordagens não podem ser utilizadas. As novas tecnologias contornam essas limitações buscando informação diretamente na molécula de DNA. A manipulação de uma sequência de DNA e a construção de moléculas quiméricas – a chamada engenharia genética – proporciona meios de estudo sobre o funcionamento de um segmento específico de DNA. Novas ferramentas bioquímicas e de genética molecular e o sequenciamento direto do DNA permitiram aos investigadores questionar e manipular as sequências genômicas bem como examinar o complemento inteiro de RNA celular, os perfis proteicos e o *status* do PTM proteico no nível molecular.

Compreender essa tecnologia é importante por várias razões: (1) ela oferece uma abordagem racional para a compreensão das bases moleculares de várias doenças. Por exemplo, a hipercolesterolemia familiar, a doença falciforme, as talassemias, a fibrose cística, a distrofia muscular, bem como doenças multifatoriais mais complexas como doenças cardíacas e vasculares, câncer e diabetes. (2) Proteínas humanas podem ser produzidas em quantidade para terapia (p. ex., insulina, hormônio do crescimento e o ativador do plasminogênio tecidual). (3) Proteínas para vacinas (p. ex., hepatite B) e para testes diagnósticos (p. ex., testes para Aids e Ebola) podem ser obtidas. (4) Essa tecnologia é utilizada para diagnosticar doenças existentes assim como para predizer o risco de desenvolvimento de uma determinada doença e a resposta individual à terapêutica farmacológica. (5) Técnicas especiais têm levado a avanços notáveis na medicina forense. (6) Terapias gênicas para potencialmente curar doenças causadas por uma deficiência de um único gene, tais como a doença falciforme, as talassemias, a deficiência da adenosina desaminase, e outras, podem ser desenvolvidas.

* Ver o glossário de termos no final deste capítulo.

A TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE ENVOLVE O ISOLAMENTO E A MANIPULAÇÃO DO DNA PARA PRODUZIR MOLÉCULAS QUIMÉRICAS

O isolamento e a manipulação do DNA, incluindo a ligação ponta-a-ponta de sequências de fontes muito diferentes para produzir as moléculas quiméricas (p. ex., moléculas que contêm tanto as sequências de DNA humanas quanto bacterianas em um modo independente de sequência), é a essência da pesquisa no DNA recombinante e envolve várias técnicas e reagentes únicos.

Enzimas de restrição clivam cadeias de DNA em localizações específicas

Certas endonucleases – enzimas que cortam o DNA em sequências de DNA específicas no interior da molécula (em oposição às exonucleases, que digerem a partir das extremidades das moléculas de DNA) – são componentes importantes na pesquisa do DNA recombinante. Essas enzimas eram chamadas de **enzimas de restrição** porque sua presença em uma determinada bactéria restringia o crescimento de determinados vírus bacterianos chamados bacteriófagos. As enzimas de restrição cortam o DNA de qualquer fonte em pequenos pedaços únicos, em uma sequência específica – ao contrário da maioria das outras enzimas, substâncias químicas ou métodos físicos, que quebram o DNA aleatoriamente. Essas enzimas defensivas (foram descobertas centenas) protegem o DNA do hospedeiro bacteriano do genoma do DNA de organismos estranhos (principalmente fagos infecciosos), inativando especificamente o DNA do fago invasor por meio da digestão. O sistema interferon induzido por RNA viral (Capítulo 38; Figura 38-11) proporciona o mesmo tipo de defesa molecular contra vírus de RNA em células de mamíferos. Entretanto, as endonucleases de restrição estão presentes apenas em células que também possuem uma enzima associada que metila especificamente o sítio do DNA do hospedeiro, tornando-o um substrato inadequado para a digestão por aquela enzima de restrição especial. Assim, **as metilases de DNA sítio-específicas** e as enzimas de restrição que têm como alvo exatamente os mesmos sítios, sempre existem em pares em uma bactéria.

As enzimas de restrição são nomeadas a partir do nome da bactéria a partir das quais elas foram isoladas. Por exemplo, *EcoRI* vem de *Escherichia coli* e *BamHI* do *Bacillus amyloliquefaciens* (**Tabela 39-1**). As primeiras três letras no nome da enzima de restrição consistem na primeira letra do gênero (*E*) e nas primeiras duas letras da espécie (*co*), que podem ser seguidas por uma designação da cepa (*R*) e o numeral romano (*I*) para indicar a ordem da descoberta (p. ex., *EcoRI* e *EcoRII*). Cada enzima reconhece e cliva uma sequência de DNA de fita dupla específica com geralmente de 4 a 7 pb de comprimento. Essa clivagem do DNA resulta em **extremidades cegas** (***blunt***) (p. ex., *HpaI*) ou **extremidades sobrepostas** (**adesivas ou coesivas**) (p. ex, *BamHI*) (**Figura 39-1**), dependendo do mecanismo utilizado pela enzima. As extremidades adesivas são particularmente úteis na construção de moléculas de DNA híbridas ou quiméricas (ver a seguir). Se os quatro nucleotídeos forem distribuídos aleatoriamente em uma determinada molécula de DNA, pode-se calcular a frequência com que uma determinada enzima irá clivar um comprimento de DNA. Para cada posição na molécula de DNA, há quatro possibilidades (A, C, G e T); portanto, uma enzima de restrição que reconhece a sequência de 4 pb cliva, em média, uma a cada 256 pb (4^4), enquanto outra enzima que reconhece uma sequência de 6 pb cliva uma a cada 4.096 pb (4^6). Um determinado pedaço de DNA possui um arranjo linear característico de sítios para as várias enzimas determinado pela sequência linear de suas bases; portanto, um **mapa de restrição** pode ser construído. Quando o DNA é digerido por uma enzima particular, as extremidades de todos os fragmentos possuem a mesma sequência de DNA. Os fragmentos produzidos podem ser isolados por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida (ver a discussão da transferência [*blotting*], a seguir); essa etapa é essencial na clonagem do DNA, bem como em várias análises do DNA, e uma utilização importante dessas enzimas.

TABELA 39-1 Endonucleases de restrição e suas especificidades de sequência

Endonucleases	Sequência reconhecida Sítios de clivagem apresentados	Fonte bacteriana
BamHI	↓ GGATCC / CCTACC ↑	*Bacillus amyloliquefaciens* H
BglII	↓ AGATCT / TCTAGA ↑	*Bacillus glolbigii*
EcoRI	↓ GAATTC / CTTAAC ↑	*Escherichia coli* RY13
EcoRII	↓ CCTGG / GGACC ↑	*Escherichia coli* R245
HindIII	↓ AAGCTT / TTCGAA ↑	*Haemophilus influenzae* R_d
HhaI	↓ GCGC / CGCG ↑	*Haemophilus haemolyticus*
HpaI	↓ GTTAAC / CAATTC ↑	*Haemophilus parainfluenzae*
MstII	↓ CCTnAGG / GGAnTCC ↑	*Microcoleus strain*
PstI	↓ CTGCAG / GACGTC ↑	*Providencia stuartii* 164
TaqI	↓ TCGA / AGCT ↓	*Thermus aquaticus* YTI

Abreviações: A, adenina; C, citosina; G, guanina; T, timina. As setas mostram o sítio de clivagem; dependendo do sítio, as extremidades do DNA de fita dupla clivado resultante são chamadas de extremidades adesivas (*BamHI*) ou extremidades cegas (*HpaI*). O comprimento da sequência de reconhecimento pode ser de 4 pb (*TaqI*), 5 pb (*EcoRII*), 6 pb (*EcoRI*), 7 pb (*MstII*) ou maior. Por convenção, esses são escritos na direção 5′-3′ para a fita superior de cada sequência de reconhecimento, e a fita inferior é mostrada com a polaridade oposta (i.e., 3′-5′). Observe que a maioria das sequências de reconhecimento são palíndromos (i.e., a sequência lida é a mesma nas direções opostas nas duas fitas). Um resíduo designado n significa que qualquer nucleotídeo é permitido.

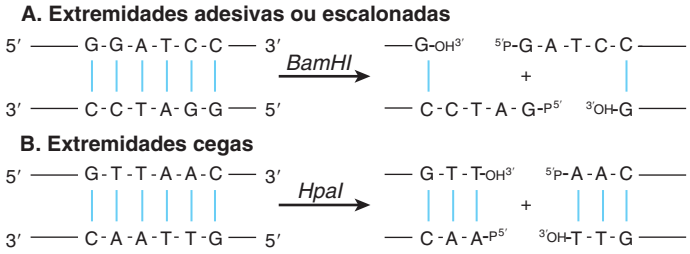


FIGURA 39-1 Resultados da digestão da endonuclease de restrição. Digestão com uma endonuclease de restrição pode resultar na formação de fragmentos de DNA com extremidades adesivas ou coesivas (**A**) ou extremidades cegas (**B**); esqueleto fosfodiéster, linhas pretas; pontes de hidrogênio entre as fitas entre bases purinas e pirimidinas, azul. Essa é uma importante consideração ao se desenvolver estratégias de clonagem.

Várias outras enzimas que agem no DNA e no RNA são uma parte importante da tecnologia do DNA recombinante. Muitas delas são referidas neste capítulo e nos próximos (**Tabela 39-2**).

Enzimas de restrição e DNA-ligases são utilizadas para preparar as moléculas de DNA quiméricas

A ligação de extremidades coesivas ou adesivas complementares de fragmentos de DNA é tecnicamente fácil, mas algumas técnicas especiais são frequentemente necessárias para superar problemas inerentes a essa abordagem. Extremidades adesivas de um vetor podem se reconectar, com nenhum ganho final de DNA. Extremidades adesivas de fragmentos também se renaturam de modo que inserções heterogêneas em *tandem* se formam. Os sítios das extremidades adesivas também podem não estar disponíveis ou em uma posição conveniente. Para contornar esses problemas, uma enzima que produza extremidades cegas pode ser utilizada. As extremidades cegas podem ser ligadas diretamente; entretanto, a ligação não é direcional. Portanto, existem duas alternativas: extremidades novas são adicionadas utilizando-se a enzima transferase terminal ou extremidades adesivas sintéticas são adicionadas. Se a poli d(G) é adicionada às extremidades 3′ do vetor e a poli d(C) é adicionada às extremidades 3′ do DNA estranho utilizando-se a transferase terminal, as duas moléculas podem apenas se renaturar entre si, contornando, assim, os problemas listados acima. Esse procedimento é chamado de formação da cauda de homopolímero (*homopolymer tailing*). Alternativamente, os ligantes do oligonucleotídeo dúplex de extremidade cega sintético, contendo a sequência de reconhecimento para uma sequência de enzima de restrição conveniente, são ligados ao DNA de extremidade cega. A ligação direta da extremidade cega é realizada utilizando-se a enzima DNA-ligase do bacteriófago T4. Essa técnica, embora menos eficiente que a ligação da extremidade adesiva, tem a vantagem de

TABELA 39-2 Algumas das enzimas usadas na pesquisa do DNA recombinante

Enzima	Reação	Uso primário
Fosfatase alcalina	Desfosforila extremidades 5′ de RNAs e DNAs	Remoção dos grupos 5′-PO_4 antes da marcação por quinase; também usada para impedir a autoligação
Nuclease BAL 31	Degrada ambas as extremidades 3′ e 5′ do DNA	Encurtamento progressivo das moléculas de DNA
DNA-ligase	Catalisa ligações entre moléculas de DNA	União de moléculas de DNA
DNA-polimerase I	Sintetiza DNA de fita dupla a partir de DNA de fita simples	Síntese de cDNA de fita dupla; tradução de cadeias com quebras; produção de extremidades cegas a partir de extremidades adesivas
Polimerases de DNA termoestáveis	Sintetizam DNA a temperaturas elevadas (60 a 80º C)	Reação em cadeia da polimerase (síntese de DNA)
DNase I	Sob condições apropriadas, produz interrupções em uma das fitas do DNA	Tradução de cadeias com quebras; mapeamento de sítios hipersensíveis; mapeamento das interações proteína-DNA
Exonuclease III	Remove nucleotídeos das extremidades 3′ do DNA	Sequenciamento do DNA; mapeamento das interações DNA-proteína
Exonuclease λ	Remove nucleotídeos das extremidades 5′ do DNA	Sequenciamento de DNA
Polinucleotídeo quinase	Transfere o fosfato terminal (posição γ) do ATP para os grupos 5′-OH do DNA ou RNA	Marcação das extremidades de DNA ou RNA com ^{32}P
Transcriptase reversa	Sintetiza DNA a partir de um molde de RNA	Síntese de cDNA a partir de mRNA; estudos de mapeamento do RNA (extremidade 5′)
S1 nuclease	Degrada o DNA de fita simples	Remoção do "grampo" na síntese do cDNA; estudos de mapeamento de RNA (extremidades 3′ e 5′)
Transferase terminal	Adiciona nucleotídeos às extremidades 3′ do DNA	Formação de cauda de homopolímero

(Adaptada e reproduzida com a permissão de Emery AEH: Página 41 em: *An Introduction to Recombinant DNA*. Wiley, 1984. Copyright c 1984 John Wiley & Sons Limited. Reproduzida com permissão).

unir quaisquer pares de extremidades. Se as extremidades cegas ou os métodos formação da cauda de homopolímero forem utilizados, não há maneira fácil de recuperar a inserção. Como um auxiliar da utilização de endonucleases de restrição, os cientistas recentemente começaram a utilizar recombinases específicas de procariotos ou de eucariotos (tais como os sítios P lox de bactérias, que são reconhecidos pela recombinase CRE, ou os sítios FRT de leveduras reconhecidos pela recombinase Flp) para catalisar a incorporação específica de dois fragmentos de DNA que carregam as sequências de reconhecimento adequadas. Essas enzimas catalisam a recombinação homóloga (Figura 35-9) entre os sítios de reconhecimento relevantes.

A clonagem amplifica o DNA

Um **clone** é uma grande população de moléculas idênticas, bactérias ou células que surgem de um ancestral comum. A clonagem molecular permite a produção de um grande número de moléculas de DNA idênticas que podem então ser caracterizadas ou utilizadas para outros propósitos. Essa técnica é baseada no fato de que as moléculas de DNA quiméricas ou híbridas podem ser construídas em **vetores de clonagem** – geralmente plasmídeos bacterianos, fagos ou cosmídeos – que, então, continuam a se replicar em uma célula hospedeira a partir de seus próprios sistemas de controle. Desse modo, o DNA quimérico é amplificado. O procedimento geral é ilustrado na **Figura 39-2**.

Os plasmídeos bacterianos são moléculas de DNA dúplex pequenas e circulares cuja função natural é conferir a resistência a antibióticos para a célula do hospedeiro. Os plasmídeos têm várias propriedades que os tornam extremamente úteis como vetores de clonagem. Eles existem como cópias únicas ou múltiplas no interior de uma bactéria e se replicam independentemente do DNA bacteriano enquanto utilizam principalmente a maquinaria de replicação do hospedeiro. A sequência de DNA completa de muitos plasmídeos é conhecida; portanto, a localização precisa dos sítios de clivagem da enzima de restrição para a inserção do DNA estranho é disponível. Os plasmídeos são menores do que o cromossomo do hospedeiro e são, portanto, facilmente separados do último, e o DNA desejado inserido no plasmídeo pode ser facilmente removido pelo corte do plasmídeo com a enzima específica para o sítio de restrição, no qual a peça original de DNA foi inserida.

Os **fagos** (**vírus bacterianos**) frequentemente possuem moléculas de DNA linear nos quais o DNA estranho pode ser inserido em vários sítios de enzimas de restrição. O DNA quimérico é

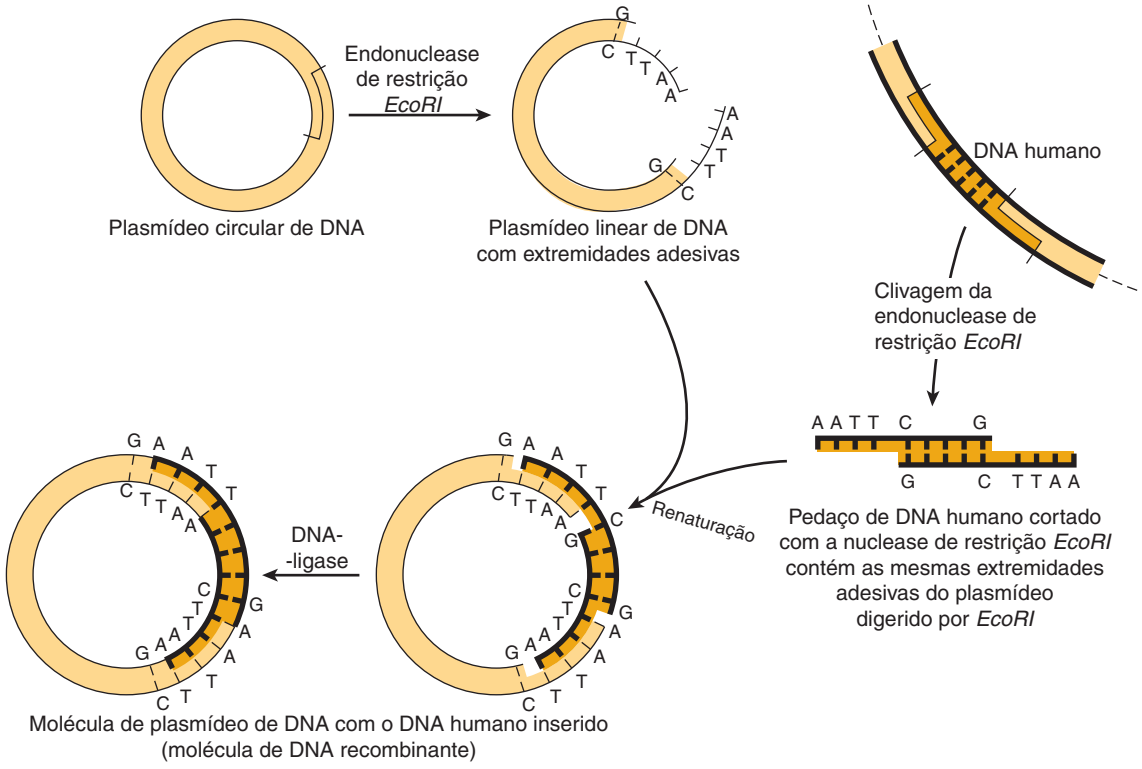


FIGURA 39-2 Uso de nucleases de restrição para produzir novas moléculas recombinantes ou quiméricas de DNA. Quando inseridos de volta em uma célula bacteriana (pelo processo chamado de transformação mediada por DNA), geralmente apenas um único plasmídeo é incorporado por uma única célula, e o plasmídeo de DNA replica não apenas a si mesmo, mas também o novo DNA inserido fisicamente ligado. Como a recombinação das extremidades adesivas, como indicado, normalmente regenera a mesma sequência de DNA reconhecida pela enzima de restrição original, o DNA inserido clonado pode ser corretamente removido do círculo de plasmídeo recombinante com essa endonuclease. Se uma mistura de todos os pedaços de DNA criados pelo tratamento da totalidade do DNA humano com uma única nuclease de restrição for usado como a fonte de DNA humano, podem ser obtidos cerca de um milhão de diferentes tipos de moléculas de DNA recombinante, cada um deles puro em seu próprio clone bacteriano. (Modificada e reproduzida com a permissão de Cohen SN: The manipulation of genes. Sci Am [July] 1975;233:25. Copyright c The Estate of Bunji Tagawa.)

TABELA 39-3 Capacidades de clonagem de vetores de clonagem comuns

Vetor	Tamanho da Inserção de DNA (kb)
Plasmídeo pUC19	0,01 a 10
Lambda charon 4A	10 a 20
Cosmídeos	35 a 50
BAC, P1	50 a250
YAC	500 a 3.000

coletado após o fago passar por seu ciclo lítico e produzir partículas de fago maduras e infectantes. Uma vantagem importante dos vetores de fagos é que, enquanto os plasmídeos podem aceitar pedaços de DNA de cerca de 6 a 10 kb de comprimento, os fagos podem aceitar fragmentos de DNA de 10 a 20 kb de comprimento, uma limitação imposta pela quantidade de DNA que pode ser acumulada na cabeça do fago durante a propagação viral.

Fragmentos maiores de DNA podem ser clonados em **cosmídeos**, que combinam as melhores características de plasmídeos e fagos. Os cosmídeos são plasmídeos que contêm as sequências de DNA, assim chamadas de **sítios *cos***, necessárias para o acondicionamento do DNA lambda em uma partícula do fago. Esses vetores crescem sob a forma de plasmídeos na bactéria, mas uma vez que a maior parte do DNA lambda desnecessário foi removido, mais DNA quimérico pode ser acumulado na cabeça da partícula. Não é incomum que os cosmídeos carreguem inserções de DNA quimérico que têm 35 a 50 kb de comprimento. Mesmo pedaços maiores do DNA podem ser incorporados ao cromossomo bacteriano artificial (**BAC**), ao cromossomo de levedura artificial (**YAC**) ou a vetores baseados em P1 (**PAC**) do bacteriófago de *E. coli*. Esses vetores irão aceitar e propagar as inserções de DNA de várias centenas ou mais de quilobases, substituindo, em grande parte, os vetores de plasmídeos, fagos e cosmídeos para algumas aplicações de clonagem e mapeamento genético de eucariotos. Uma comparação desses vetores é mostrada na **Tabela 39-3**.

Como a inserção do DNA em uma região funcional do vetor irá interferir com a ação desta região, deve-se tomar cuidado para não interromper uma função essencial desse vetor. Esse conceito pode ser explorado, entretanto, para proporcionar uma técnica de seleção. Por exemplo, um vetor inicial de plasmídeo comum, **pBR322**, possui ambos os genes de resistência para **tetraciclina (tet)** e **ampicilina (amp)**. Um único sítio da enzima de restrição *PstI* no interior do gene de resistência amp é comumente utilizado como o sítio de inserção para um pedaço de DNA estranho. Além de possuir extremidades adesivas (Tabela 39-1 e Figura 39-1), o DNA inserido nesse sítio destrói o gene de resistência amp e torna a bactéria que transporta esse plasmídeo sensível a amp **(Figura 39-3)**. Assim, as células que carregam o plasmídeo parental, que fornece a resistência a ambos os antibióticos, podem ser facilmente diferenciadas e separadas das células que carregam o plasmídeo quimérico, que é resistente apenas à tetraciclina. Os YAC contêm funções de seleção, replicação e segregação que funcionam tanto em células de bactérias quanto em células de leveduras e, portanto, podem ser propagadas em ambos os organismos.

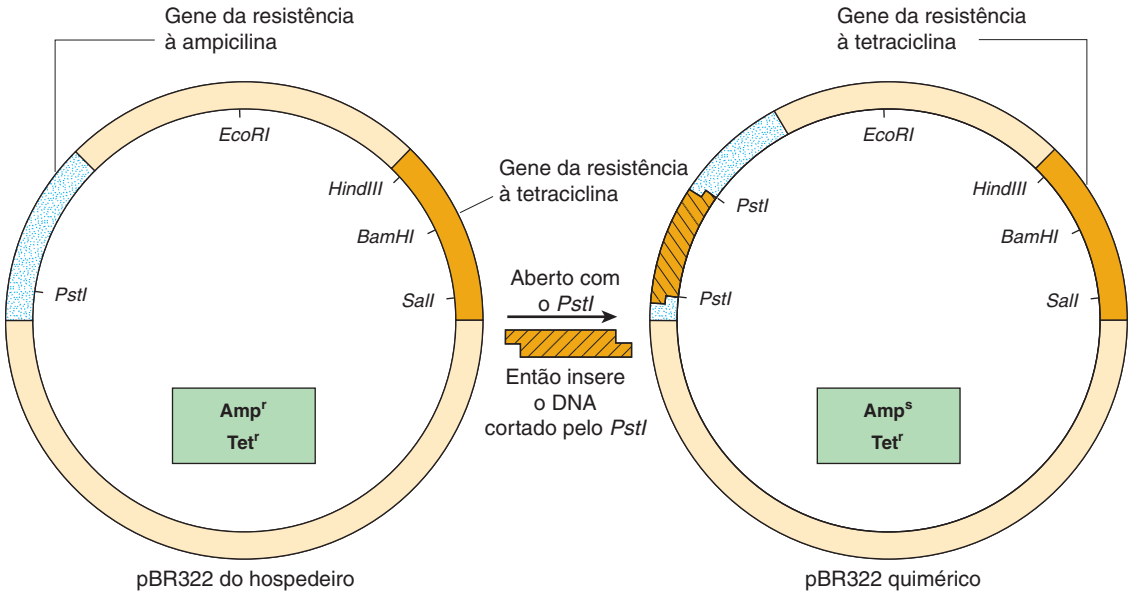


FIGURA 39-3 Um método para detectar recombinantes para os fragmentos de DNA inseridos. Usando o plasmídeo pBR322, um pedaço de DNA é inserido no sítio único *PstI*. Essa inserção destrói o gene que codifica uma proteína que fornece resistência à ampicilina para o hospedeiro bacteriano. Portanto, as células que carregam o plasmídeo quimérico não sobreviverão mais quando colocadas em um meio que contenha esse antibiótico. A sensibilidade diferencial à tetraciclina e ampicilina pode, portanto, ser usada para distinguir clones de plasmídeos que contenham uma inserção. Um esquema similar, dependendo da produção de uma fusão *in-frame* de um DNA recentemente inserido, produzindo um fragmento de peptídeo capaz de complementar uma forma inativa, truncada de forma N-terminal da enzima β-galactosidase, um componente do óperon *lac* (Figura 38-2), permite a formação de colônias azuis-brancas nas placas de ágar contendo um corante hidrolizável pelo β-galactosídeo. As colônias galactosidase-positivas são azuis; tais colônias contêm plasmídeos nos quais um DNA foi inserido de forma bem-sucedida.

Além dos vetores descritos na Tabela 39-3, que são desenhados principalmente para a propagação em células bacterianas, vetores para a propagação em células de mamíferos e para inserção do gene (cDNA)/expressão proteica também foram desenvolvidos. Esses vetores são baseados em diversos vírus de eucariotos compostos por genomas de RNA ou DNA. Exemplos notáveis de tais **vetores virais** são aqueles que utilizam genomas **adenovirais (Ad)** ou **genomas virais associados a adenovírus (AAV)** (baseados em DNA) e **retrovirais** (baseados em RNA). Embora um pouco limitados quanto ao tamanho das sequências de DNA que podem ser inseridas, tais **vetores de clonagem viral de mamíferos** compensam essa lacuna, pois, de maneira eficiente, irão infectar uma grande variedade de tipos celulares diferentes. Por essa razão, vários vetores virais de mamíferos estão sendo investigados para o uso em **terapia gênica**, e são comumente usados em experimentos de laboratório.

Uma biblioteca é uma coleção de clones recombinantes

A combinação de enzimas de restrição e de vários vetores de clonagem permite que o genoma inteiro de um organismo seja acondicionado individualmente em um vetor. Uma coleção desses diferentes clones recombinantes é chamada de uma biblioteca. Uma **biblioteca genômica** é preparada a partir do DNA total de uma célula ou de um tecido. Uma **biblioteca de cDNA** compreende as cópias de DNA complementares da população de mRNA em um tecido. As bibliotecas de DNA genômico são frequentemente preparadas pela realização da **digestão parcial do DNA total** com uma enzima de restrição que corta o DNA com frequência (p. ex., uma cortadora de quatro bases, tal como a *TaqI*). A ideia é gerar fragmentos bastante grandes para que a maioria dos genes fique intacta. Os vetores BAC, YAC e P1 são os preferidos, uma vez que podem aceitar fragmentos muito grandes de DNA e, assim, oferecer uma chance melhor de isolamento de um gene codificador de mRNA eucariótico intacto em um único fragmento de DNA.

Um vetor no qual a proteína codificada pelo gene introduzido pela tecnologia do DNA recombinante é, na verdade, sintetizado, é conhecido como um **vetor de expressão**. Atualmente, tais vetores são comumente usados para detectar moléculas de DNA específicas em bibliotecas e para produzir proteínas por meio de técnicas de engenharia genética. Esses vetores são especialmente construídos para conter promotores induzíveis muito ativos, códons de iniciação adequados para tradução *in phase*, sinais de terminação de transcrição e tradução e sinais de processamento de proteínas adequados, se necessário. Alguns vetores de expressão contêm até genes que codificam inibidores de protease, de modo que o rendimento final do produto é aumentado. Curiosamente, como o custo da síntese do DNA sintético caiu, muitos pesquisadores geralmente sintetizam um cDNA inteiro (gene) de interesse (em segmentos de 100 a 150 nt), incorporando as preferências de códons do hospedeiro utilizado para expressão a fim de maximizar a produção de proteína. Novas técnicas eficazes na síntese do DNA sintético permitem atualmente a síntese *de novo* de genes completos e mesmo de genomas. Esses avanços inauguram novas e emocionantes possibilidades na biologia sintética, enquanto, concomitantemente, introduzem potenciais dilemas éticos.

Sondas pesquisam bibliotecas ou amostras complexas em busca de genes específicos ou moléculas de cDNA

Várias moléculas podem ser utilizadas como "sondas" em bibliotecas para pesquisar um gene específico ou uma molécula de cDNA ou para definir e quantificar o DNA ou RNA separados por eletroforese por meio de vários géis. As sondas são geralmente partes de DNA ou RNA marcadas com um nucleotídeo que contém um ^{32}P – ou nucleotídeos marcados com fluorescência (mais utilizados atualmente). É importante notar que nenhuma modificação (^{32}P ou marcação com fluorescência) afeta as propriedades de hibridização das sondas de ácido nucleico marcadas resultantes. A sonda deve reconhecer uma sequência complementar para ser efetiva. Um cDNA sintetizado a partir de um mRNA específico pode ser utilizado para rastrear tanto uma biblioteca de cDNA para um cDNA mais longo quanto uma biblioteca genômica para um sequência complementar na região codificadora de um gene. Uma técnica popular para encontrar genes específicos implica em pregar uma sequência de aminoácido curta e, usando o códon utilizado para essas espécies (ver Capítulo 37), fazer uma sonda de oligonucleotídeos (ou mistura de sonda) que irá detectar o fragmento de DNA correspondente em uma biblioteca genômica. Se as sequências correspondem exatamente, as sondas de 15 a 20 nucleotídeos de comprimento irão hibridizar. As sondas de cDNA são utilizadas para detectar fragmentos de DNA em transferências de *Southern blot* e para detectar e quantificar RNA em transferências de *Northern blot*. Anticorpos específicos também podem ser utilizados como sondas, desde que o vetor utilizado sintetize moléculas de proteínas que sejam reconhecidas por eles.

Técnicas de transferência (*blotting*) e hibridização permitem a visualização de fragmentos específicos

A visualização de um fragmento de DNA ou RNA específico entre as milhares de moléculas "contaminantes" em uma amostra complexa requer a convergência de várias técnicas, coletivamente chamadas de **transferência** (***blotting***). A **Figura 39-4** ilustra os procedimentos de transferência ***Southern*** (DNA), ***Northern*** (RNA) e ***Western*** (proteína) *blot*. O primeiro foi nomeado com o nome da pessoa que inventou a técnica (Edward Southern), e os outros nomes começaram como jargões de laboratório e agora são termos aceitos. Esses procedimentos são úteis para determinar quantas cópias de um gene estão em um determinado tecido ou se há quaisquer alterações em um gene (deleções, inserções ou rearranjos), porque a etapa de eletroforese requisitada separa as moléculas com base no tamanho. Ocasionalmente, se uma base específica é mudada e um sítio de restrição é alterado, esses procedimentos podem detectar uma mutação pontual. As técnicas de transferência *Northern* e *Western* são utilizadas para determinar o tamanho e a quantidade de RNA específico e de moléculas de proteínas, respectivamente. Uma quarta técnica de hibridização, o ***Southwestern*** *blot*, examina as interações proteína-DNA (não mostrada). Nesse método, as proteínas são separadas por eletroforese, removidas para uma membrana, renaturadas e analisadas em busca de uma interação com uma sequência específica

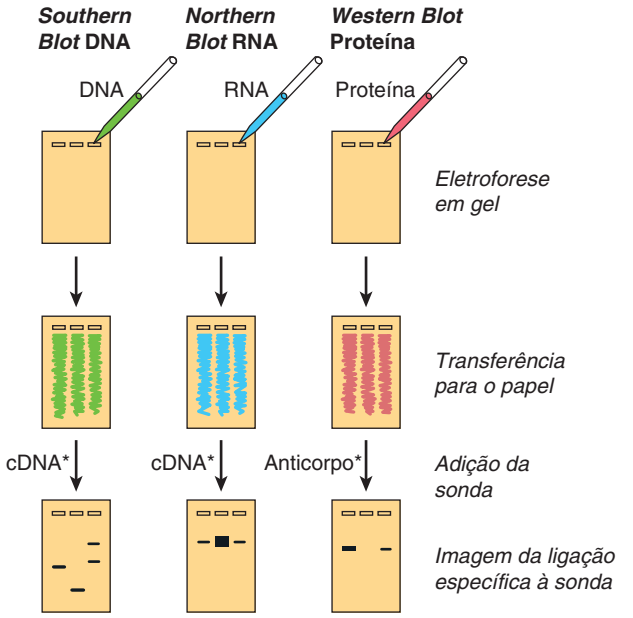


FIGURA 39-4 O procedimento de transferência (*blotting*). Em um *Southern blot*, ou transferência de DNA, o DNA isolado de uma linhagem celular ou de um tecido é digerido por uma ou mais enzimas de restrição. Essa mistura é pipetada em um reservatório em um gel de agarose ou poliacrilamida e exposto a uma corrente elétrica direta. O DNA, carregado negativamente, migra na direção do ânodo; os fragmentos menores se movem mais rapidamente. Após um tempo adequado, o DNA no interior do gel é desnaturado pela exposição a bases fracas e transferido para nitrocelulose ou papel náilon, resultando em uma réplica exata do padrão no gel, pela técnica de transferência desenvolvida por *Southern*. O DNA é ligado ao papel pela exposição ao calor ou UV, e o papel então é exposto à sonda marcada de cDNA, que hibridiza com fitas complementares no filtro. Após cuidadosa lavagem, o papel é exposto ao filme de raio X ou a uma tela de imagem, que é desenvolvida para revelar várias bandas específicas correspondendo ao fragmento de DNA que reconheceu as sequências na sonda de cDNA. A transferência de RNA ou *Northern blot* é conceitualmente semelhante. O RNA é sujeito à eletroforese antes da transferência. Isto demanda algumas etapas diferentes daquelas da transferência de DNA, principalmente para garantir que o RNA permaneça intacto e geralmente é um pouco mais difícil. Na transferência de proteína, ou *Western blot*, as proteínas sofrem eletroforese e são transferidas para o papel especial, que avidamente se liga a proteínas, e então esquadrinhadas com um anticorpo específico ou outra molécula sonda (os asteriscos indicam marcação, tanto radiativa quanto fluorescente). No caso do *Southwestern blotting* (ver texto; não apresentado), uma transferência de proteína semelhante àquela mostrada anteriormente como *Western* é exposta a ácidos nucleicos marcados e os complexos proteína-ácido nucleico formados são detectados por autorradiografia ou imagem.

por meio da incubação com uma sonda de ácido nucleico especificamente marcada.

A **hibridização de colônias ou placas** é um método pelo qual clones específicos são identificados e purificados. As bactérias são cultivadas em colônias em uma placa de ágar e revestidas com um filtro de papel orientado de nitrocelulose. As células de cada colônia aderem ao filtro e são fixadas permanentemente nele por calor ou UV que, com o tratamento com NaOH, também lisam as células e desnaturam o DNA, de modo que ele se torna disponível para hibridizar com a sonda. Uma sonda radioativa é adicionada ao filtro, e (após lavagem) o complexo híbrido é localizado expondo o filtro ao filme de raio X ou tela de imagem. Ao combinar o ponto a uma colônia na autorradiografia (filme de raio X exposto e revelado), a última pode ser retirada da placa. Uma estratégia semelhante é utilizada para identificar fragmentos em bibliotecas de fagos. Rodadas sucessivas desse procedimento resultam em um isolado clonal (colônia bacteriana) ou placa de fago individual que contém uma inserção única de DNA.

Todos os procedimentos de hibridização discutidos nesta seção dependem das propriedades específicas de pareamento de bases de fitas de ácidos nucleicos complementares descritas anteriormente. Combinações perfeitas hibridizam prontamente e suportam temperaturas elevadas nas reações de hibridização e lavagem. Complexos específicos também se formam devido à presença de baixas concentrações de sal. Combinações menos perfeitas não toleram tais **condições rigorosas** (i.e., temperaturas elevadas e baixas concentrações de sais); assim, a hibridização pode nunca ocorrer ou ser interrompida durante a etapa de lavagem. Famílias de genes, nas quais há algum grau de homologia, podem ser detectados variando-se a rigidez das condições das etapas de hibridização e lavagem. Comparações de um determinado gene entre espécies também podem ser feitas utilizando-se essa abordagem. As condições de hibridização capazes de detectar uma única combinação errônea de pares de bases (pb) entre a sonda e o alvo foram desenvolvidas.

Técnicas manuais e automatizadas estão disponíveis para determinar a sequência do DNA

Os segmentos de moléculas específicas de DNA obtidas por tecnologia do DNA recombinante podem ser analisados para determinar sua sequência de nucleotídeos. Este método depende da ocorrência de um grande número de moléculas de DNA idênticas. Essa necessidade pode ser satisfeita pela clonagem do fragmento de interesse, utilizando as técnicas acima descritas, ou utilizando métodos de PCR (ver a seguir). O **método enzimático manual** (**Sanger**) utiliza didesoxinucleotídeos específicos que terminam a síntese da fita de DNA em nucleotídeos específicos à medida que a fita é sintetizada no molde de ácido nucleico purificado. As reações são ajustadas, de modo que uma população de fragmentos de DNA, que representam a terminação em cada nucleotídeo, é obtida. Com a incorporação de uma marcação radioativa no sítio de terminação, pode-se separar os fragmentos de acordo com o tamanho utilizando-se a eletroforese em gel de poliacrilamida. Uma autorradiografia é feita, e cada um dos fragmentos produz uma imagem (banda) no filme de raio X ou placa de imagem. Estas são lidas para fornecer a sequência de DNA (**Figura 39-5**). Outro método manual é o de **Maxam e Gilbert**, que emprega **métodos químicos** para clivar as moléculas de DNA onde elas contêm os nucleotídeos específicos. As técnicas que não necessitam do uso de radioisótopos são empregadas no sequenciamento automatizado do DNA. A mais empregada é um procedimento automatizado em que quatro marcações fluorescentes diferentes – cada uma representando um nucleotídeo – são utilizadas. Cada uma emite um sinal específico após excitação por feixe de *laser* de um determinado comprimento de onda, que é medido por detectores sensíveis, e isto pode ser registrado em

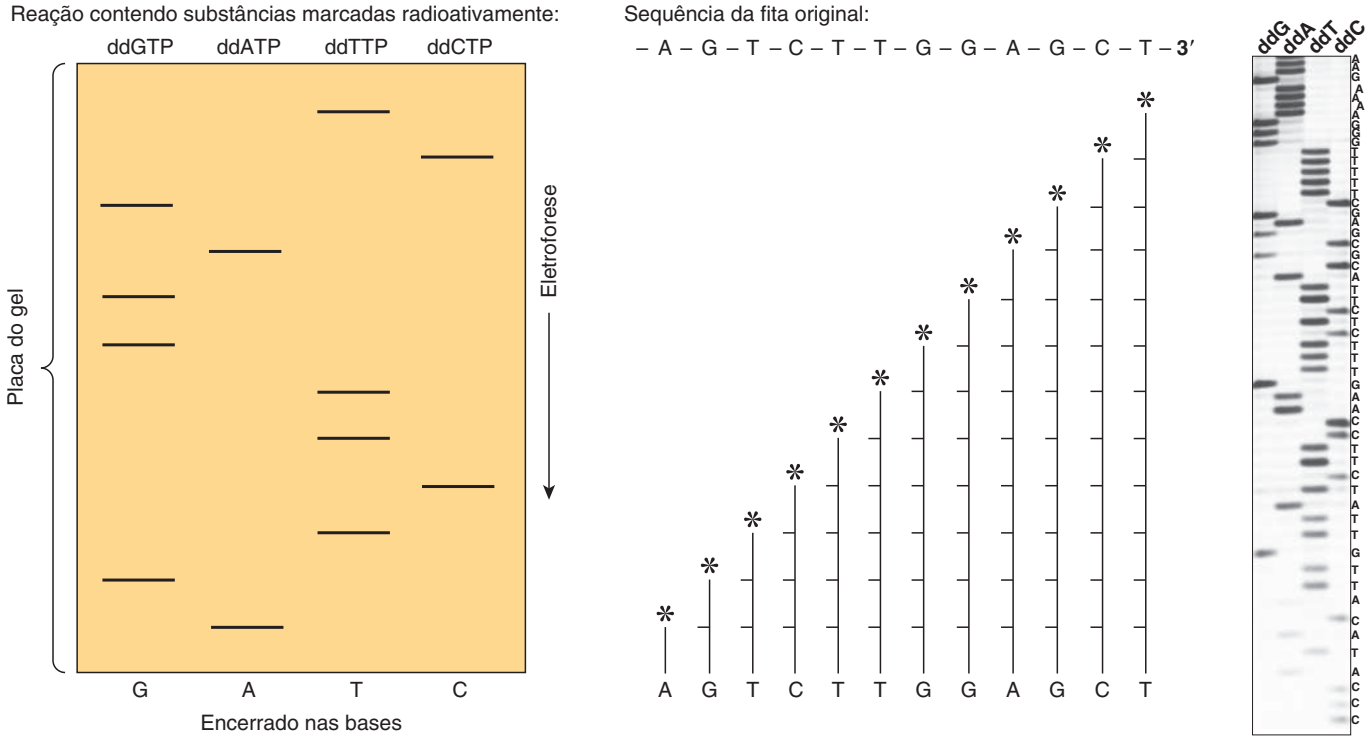


FIGURA 39-5 Sequenciamento do DNA pelo método de terminação de cadeia desenvolvido por Sanger. Os arranjos em forma de escada representam de baixo para cima todos os fragmentos sucessivamente mais longos da fita de DNA original. Sabendo-se qual reação específica de didesoxinucleotídeos foi feita para produzir cada mistura de fragmentos, pode-se determinar a sequência de nucleotídeos da extremidade não marcada à extremidade marcada (*) lendo-se o gel. As regras de pareamento de Watson e Crick (A-T, G-C) ditam a sequência da outra fita, a complementar (asteriscos indicam local de marcação radioativa). São mostrados (**esquerda, centro**) os produtos da síntese encerrada de um fragmento hipotético de DNA, cuja sequência é apresentada. É mostrado um autorradiograma (**direita**) de um conjunto verdadeiro de reações de sequenciamento de DNA que empregou os quatro didesoxinucleotídeos marcados com ^{32}P indicados no topo do autorradiograma digitalizado (i.e., didesoxi (dd)G, ddA, ddT, ddC). A eletroforese foi feita de cima para baixo. A sequência de DNA deduzida é listada no lado direito do gel. Observe a relação log-linear entre distância de migração (i.e., de cima para baixo do gel) e o comprimento dos fragmentos de DNA. Modernos sequenciadores de DNA não mais utilizam a eletroforese em gel para o fracionamento dos produtos sintetizados marcados. Além disso, nas plataformas de sequenciamento NGS, a síntese é seguida pelo monitoramento da incorporação dos quatro dXTPs marcados fluorescentemente.

um computador. As máquinas de sequenciamento de DNA mais recentes utilizam nucleotídeos marcados com fluorescência, mas detectam a incorporação utilizando a microscopia óptica. Essas máquinas reduziram o custo do sequenciamento do DNA em mais de 100 vezes. As reduções no custo inauguraram a era do sequenciamento do genoma personalizado. De fato, utilizando essa nova tecnologia, a sequência do codescobridor da dupla-hélice, James Watson, foi completamente determinada.

A síntese de oligonucleotídeos é agora rotineira

A síntese química automatizada de oligonucleotídeos moderadamente longos (cerca de 100 nucleotídeos) de sequência precisa é, atualmente, um procedimento de rotina no laboratório. Cada ciclo de síntese leva apenas alguns minutos e, portanto, uma molécula inteira pode ser produzida por meio da síntese de fragmentos relativamente curtos que podem, então, ser ligados uns aos outros. Como mencionado anteriormente, o processo pode ser miniaturizado e realizado significativamente em paralelo, a fim de permitir a síntese de 100s a 1.000s de sequências definidas de nucleotídeos simultaneamente. Os oligonucleotídeos são, agora, indispensáveis para o sequenciamento do DNA, rastreamento de biblioteca, ensaios de ligação proteína-DNA, reação em cadeia da polimerase (PCR) (ver a seguir), mutagênese direcionada por sítio, síntese de gene sintético e várias outras aplicações.

O método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) amplifica as sequências de DNA

O **PCR** é um método de amplificação da sequência alvo de DNA. O desenvolvimento do PCR revolucionou os modos pelos quais o DNA e o RNA podem ser estudados. Ele fornece um meio extremamente rápido, sensível e seletivo de amplificação de qualquer sequência de DNA desejada. A especificidade está baseada no uso de dois *primers* de oligonucleotídeos que hibridizam com sequências complementares em fitas opostas de DNA e flanqueiam a sequência alvo (**Figura 39-6**). A amostra de DNA é primeiramente aquecida para separar as duas fitas do molde de DNA que contêm a sequência alvo; os *primers*, adicionados em grande quantidade, podem se renaturar (hibridizar) com o DNA; e cada fita é copiada por uma DNA-polimerase, começando nos sítios dos *primers*, em presença de todos os quatro dXPTs. Cada uma das duas fitas de DNA

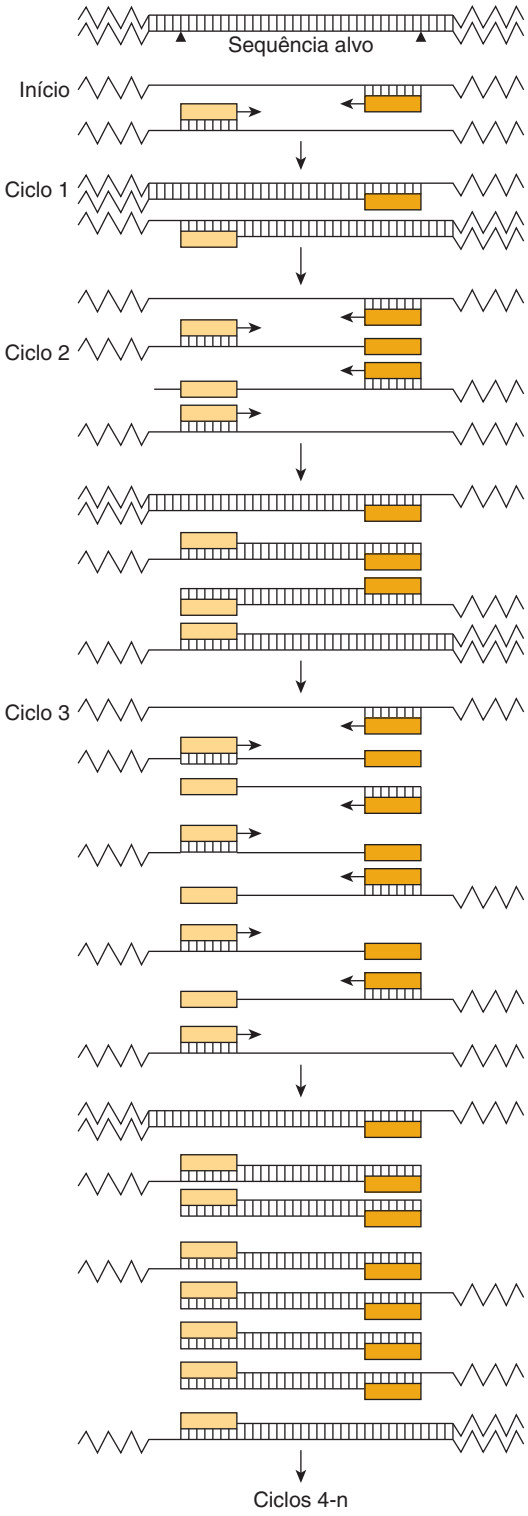


FIGURA 39-6 A reação em cadeia da polimerase é usada para amplificar as sequências gênicas específicas. O DNA de fita dupla é aquecido para ser separado em suas fitas individuais. Estas se ligam a dois *primers* distintos que são direcionados a sequências específicas nas fitas opostas e que definem o segmento a ser amplificado. A DNA-polimerase estende os *primers* em cada direção e sintetiza duas fitas complementares às duas originais. Este ciclo é repetido várias vezes, produzindo um produto amplificado de comprimento e sequência definidos. Observe que os dois *primers* estão presentes em grande excesso.

serve de molde para a síntese do novo DNA, a partir dos dois *primers*. Ciclos repetidos de desnaturação por calor, renaturação dos *primers* com suas sequências complementares e a extensão dos *primers* renaturados com a DNA-polimerase resulta em uma amplificação exponencial dos segmentos de DNA de comprimento definido (o dobro a cada ciclo). As reações iniciais de PCR utilizavam uma DNA-polimerase de *E. coli* que era destruída em cada ciclo de desnaturação por calor e, portanto, era necessário ser readicionada no início de cada ciclo. A substituição por uma DNA-polimerase termoestável de *Thermus aquaticus* (ou a DNA-polimerase correspondente de muitas outras bactérias termofílicas), um organismo que vive e replica a uma temperatura de 70 a 80°C, elimina esse problema e tornou possível a automação da reação, uma vez que as reações de polimerase podem ser executadas a 70°C. Isto também melhorou a especificidade e o rendimento do DNA.

As sequências de DNA tão curtas quanto 50 a 100 pb e tão longas quanto 10 kb podem ser amplificadas. Vinte ciclos fornecem uma amplificação de 10^6 (i.e., 2^{20}) e 30 ciclos, 10^9 (2^{30}). Cada ciclo leva $\leq$ 5 a 10 min, de modo que mesmo grandes moléculas de DNA podem ser amplificadas rapidamente. O PCR permite que o DNA de uma única célula, folículo piloso ou espermatozoide possa ser amplificado e analisado. Assim, as aplicações do PCR para a medicina forense são óbvias. O PCR também é utilizado para (1) detectar agentes infecciosos, especialmente vírus latentes; (2) para fazer diagnósticos genéticos pré-natais; (3) detectar polimorfismos alélicos; (4) estabelecer tipos de tecidos precisos para transplantes; (5) estudar evolução, utilizando o DNA de amostras arqueológicas; (6) para análises quantitativas do RNA após copiar o RNA e quantificar o mRNA, pelo assim chamado método de RTPCR (cópias de cDNA de mRNA gerado por uma transcriptase reversa retroviral); (7) para registrar a ocupação *in vivo* do DNA-proteína, utilizando ensaios de imunoprecipitação de cromatina para facilitar o sequenciamento NGS (ver a seguir). Há igual número de aplicações do PCR para problemas em ciências básicas e novos usos são desenvolvidos a cada ano.

AS APLICAÇÕES PRÁTICAS DA TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE SÃO NUMEROSAS

O isolamento de um gene específico codificador de mRNA (ca. 1.000 pb) a partir de um genoma inteiro exige uma técnica que irá discriminar uma parte em um milhão. A identificação de uma região reguladora, que pode ter apenas 10 pb de comprimento, exige uma sensibilidade de uma parte em 3×10^8; uma doença como a anemia falciforme é causada por uma única mudança de base, ou uma parte em 3×10^9. A tecnologia do DNA é bastante poderosa para realizar todas essas atividades.

O mapeamento genético localiza genes específicos em cromossomos distintos

A localização de genes pode, portanto, definir um mapa do genoma humano, o que já está produzindo informação útil na definição de doenças humanas. A hibridização de células somáticas e a hibridização *in situ* são duas técnicas utilizadas para realizar esse

objetivo. Na **hibridização *in situ***, o procedimento mais simples e direto, uma sonda radioativa é adicionada a uma dispersão de cromossomos em metáfase sobre uma lâmina de vidro. A área exata da hibridização é localizada por emulsão fotográfica de camadas sobre a lâmina e, após exposição, pelo alinhamento dos grânulos com alguma identificação histológica do cromossomo. A **hibridização *in situ* com fluorescência (FISH), que utiliza sondas com marcação fluorescente em vez de radioativa**, é uma técnica muito sensível, também usada para esse propósito. Isso frequentemente coloca o gene em um local de uma determinada banda ou região do cromossomo. Alguns dos genes humanos localizados pelo uso dessas técnicas são listados na **Tabela 39-4**. Essa tabela representa apenas uma amostra dos genes mapeados a partir de dezenas de milhares de genes que foram mapeados como resultado do sequenciamento recente do genoma humano. Uma vez localizado o defeito em uma região do DNA que tem a estrutura característica de um gene, uma cópia de cDNA sintético do gene pode ser construída, que contenha apenas éxons codificadores de mRNA, que seja expressa em um vetor adequado e que sua função possa ser acessada – ou o peptídeo putativo, deduzido da fase de leitura aberta na região codificadora, possa ser sintetizado. Anticorpos direcionados contra esse peptídeo podem ser utilizados para avaliar se este é expresso em pessoas normais e se está ausente ou alterado naquelas com a síndrome genética.

Proteínas podem ser produzidas para pesquisas, diagnósticos e fins comerciais

Um objetivo prático da pesquisa do DNA recombinante é a produção de materiais para aplicações biomédicas. Essa tecnologia tem dois méritos distintos: (1) ela pode fornecer grandes quantidades de material que não poderia ser obtido por métodos de purificação convencional (p. ex., interferon, fator ativador do plasminogênio tecidual, etc.); (2) ela pode fornecer material humano (p. ex., insulina e hormônio de crescimento). As vantagens em ambos os casos são óbvias. Embora o objetivo principal seja o fornecimento de produtos – geralmente proteínas – para tratamento (insulina) e diagnóstico (teste de Aids) de doenças humanas e de outros animais e para a prevenção de doenças (vacina para hepatite B), há outras aplicações comerciais potenciais, especialmente na agricultura. Um exemplo é a tentativa para desenvolver plantas mais resistentes à seca ou a temperaturas extremas, mais eficientes na fixação do nitrogênio ou que produzam sementes contendo o complemento completo de aminoácidos essenciais (arroz, trigo, milho, etc.).

TABELA 39-4 Localização dos genes humanos[1]

Gene	Cromossomo	Doença
Insulina	11p15	Diabetes
Prolactina	6p23-q12	Síndrome de Sheehan
Hormônio do crescimento	17q21-qter	Deficiência do hormônio de crescimento
α-Globina	16p12-pter	α-Talassemia
β-Globina	11p12	β-Talassemia, anemia falciforme
Adenosina-desaminase	20q13-qter	Deficiência da adenosina-desaminase
Fenilalanina hidroxilase	12q24	Fenilcetonúria
Hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase	Xq26-q27	Síndrome de Lesch-Nyhan
DNA segmento G8	4p	Coreia de Huntington

[1] Esta tabela indica a localização cromossomal de vários genes e as doenças associadas à deficiência ou produção anormal de produtos gênicos. O cromossomo envolvido é indicado pelo primeiro número ou letra. Os outros números e letras se referem às localizações precisas, como definido em McKusick, Victor A., MD, *Mendelian Inheritance in Man: Catalogs of Autosomal Dominant, Autosomal Recessive, and X-Linked Phenotypes.* Copyright © 1983 Johns Hopkins University Press. Reimpressa com a permissão de the Johns Hopkins University Press.

A tecnologia do DNA recombinante é utilizada na análise molecular de doenças

Variações do gene normal

Há uma variação normal da sequência do DNA, tal como acontece com aspectos mais óbvios da estrutura humana. Variações da sequência de DNA, os **polimorfismos**, ocorrem aproximadamente uma vez a cada 500 a 1.000 nucleotídeos. Uma comparação recente da sequência de nucleotídeos do genoma de James Watson, o codescobridor da estrutura do DNA, identificou cerca de 3.300.000 polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em relação ao "padrão" do genoma humano de referência inicialmente sequenciado. Curiosamente, mais de 80% dos SNP encontrados no DNA de Watson já foram identificados em outros indivíduos. Há também deleções genômicas e inserções de DNA (i.e., **variações no número de cópias**; **CNV**) bem como substituições de uma única base. Em pessoas saudáveis, essas alterações obviamente ocorrem em regiões não codificadoras do DNA ou em locais que não causam mudança na função da proteína codificada. Esse polimorfismo hereditário da estrutura do DNA pode estar associado a certas doenças no interior de uma grande linhagem, e pode ser utilizado para pesquisar o gene envolvido específico, como ilustrado adiante. Ele também pode ser usado em várias aplicações na medicina forense.

Variações gênicas que provocam doenças

A genética clássica ensinou que a maioria das doenças genéticas se devia a mutações pontuais que resultavam em uma proteína alterada. Isso ainda pode ser verdade, mas se na leitura de capítulos anteriores previu-se que a doença genética poderia resultar da perturbação de qualquer uma das etapas que levam da replicação para a transcrição e subsequentemente para o processamento/transporte do RNA e síntese proteica, teria se feito uma avaliação mais adequada. Esse ponto é novamente bem ilustrado pelo exemplo do gene da β-globina. Este gene está localizado em um agrupamento no cromossomo 11 (**Figura 39-7**), e uma versão expandida dele é ilustrada na **Figura 39-8**. A produção defeituosa da β-globina resulta em várias doenças e se deve a muitas lesões diferentes no e em volta do gene da β-globina (**Tabela 39-5**).

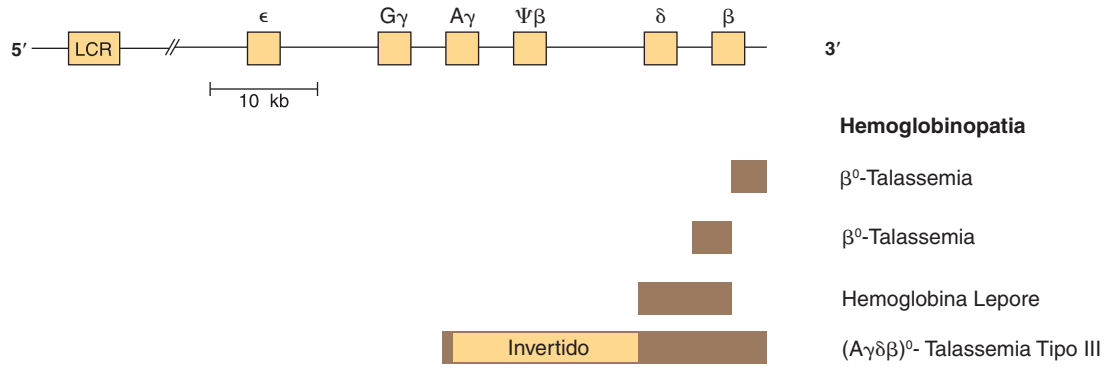


FIGURA 39-7 Representação esquemática do agrupamento do gene da β-globina e das lesões em alguns distúrbios genéticos. O gene da β-globina está localizado no cromossomo 11 em associação estreita com os dois genes da γ-globina e com o gene da δ-globina. A família do gene β é disposta na ordem 5′-ε-Gγ-Aγ-Ψβ-δ-β-3′. O *locus* ε é expresso no início da vida embrionária (como $\alpha_2\varepsilon_2$). Os genes γ são expressos na vida fetal, formando a hemoglobina fetal (HbF, $\alpha_2\gamma_2$). A hemoglobina adulta consiste em HbA ($\alpha_2\beta_2$) ou HbA_2 ($\alpha_2\delta_2$). O Ψβ é um pseudogene que tem homologia de sequência com β, mas contém mutações que impedem a sua expressão. Uma região controladora do *locus* (LCR), um intensificador poderoso localizado a montante (5′) do gene, controla a taxa de transcrição de todo o agrupamento do gene da β-globina. Deleções (barra sólida) do *locus* β provocam a β-talassemia (deficiência ou ausência [β^0] da β-globina). Uma deleção de δ e β provoca a hemoglobina Lepore (apenas hemoglobina está presente). Uma inversão $(A\gamma\delta\beta)^0$ nessa região (barra maior) interrompe o funcionamento do gene e também resulta em talassemia (tipo III). Cada tipo de talassemia tende a ser encontrada em um certo grupo de pessoas, por exemplo, a inversão $(A\gamma\delta\beta)^0$ ocorre em indivíduos provenientes da Índia. Muito mais deleções nessa região foram mapeadas e cada uma causa um tipo de talassemia.

Mutações pontuais

O exemplo clássico é a **doença falciforme**, que é causada por uma mutação de uma única base de um total de 3×10^9 no genoma, uma substituição de T por A no DNA que, por sua vez, resulta em uma mudança de A para U no mRNA correspondente ao sexto códon do gene da β-globina. O códon alterado especifica um aminoácido diferente (valina em vez de ácido glutâmico) e isto causa uma anormalidade estrutural na molécula da β-globina. Outras mutações pontuais no e em volta do gene da β-globina resultam em uma diminuição ou, em alguns casos, na ausência de produção de β-globina; a β-talassemia é o resultado dessas mutações. As talassemias são caracterizadas por defeitos na síntese de subunidades da hemoglobina e, portanto, a β-talassemia resulta da insuficiência da produção da β-globina. A Figura 39-8 ilustra aquelas mutações pontuais que afetam cada um dos muitos processos envolvidos na geração de um mRNA normal (e, portanto, uma proteína normal) que foram implicadas como uma causa de β-talassemia.

Deleções, inserções e rearranjos do DNA

Estudos em bactérias, vírus, leveduras, mosca-da-fruta e, agora, humanos, mostraram que partes do DNA podem se mover de um lugar para outro no interior do genoma. A deleção de uma parte crítica de DNA, o rearranjo do DNA no interior do gene ou a inserção ou amplificação de uma parte de DNA no interior de uma região codificadora ou reguladora podem causar mudanças na expressão do gene, resultando em doença. Novamente, uma análise molecular de talassemias produz numerosos exemplos desses processos – particularmente deleções – como causas de doenças (Figura 39-7). Os grupos de genes da globina parecem particularmente propensos a essa lesão. As deleções no agrupamento da α-globina, localizado no cromossomo 16, causa a α-talassemia. Há uma forte associação étnica para muitas dessas deleções, de modo que os europeus do norte, os filipinos, os negros e os povos mediterrâneos apresentam diferentes lesões, todas resultando na ausência da hemoglobina A e α-talassemia.

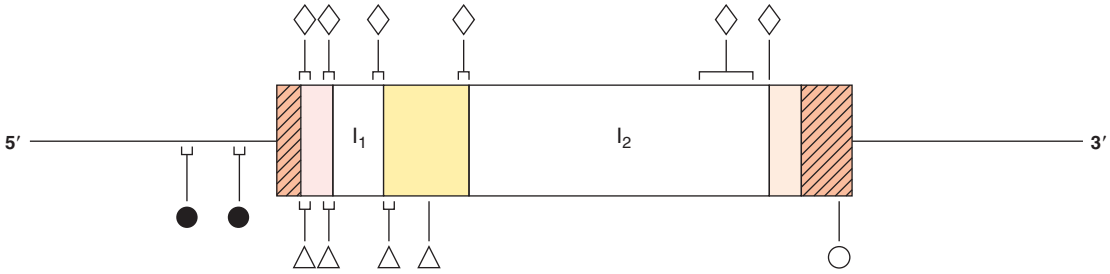


FIGURA 39-8 Mutações no gene da β-globina causando β-talassemia. O gene da β-globina é mostrado na orientação 5′–3′. As áreas hachuradas indicam as regiões não traduzidas 5′ e 3′. Lendo na direção 5′–3′, as áreas sombreadas são éxons 1 a 3 e os espaços claros são íntrons 1 (I_1) e 2 (I_2). Mutações que afetam o controle da transcrição (●) estão localizadas na região de acompanhamento 5′ do DNA. Exemplos de mutações sem sentido (△), mutações no processamento do RNA (◇) e mutações de clivagem do RNA (○) foram identificadas e são indicadas. Em algumas regiões, várias mutações distintas foram encontradas. Estas são indicadas por colchetes.

TABELA 39-5 Alterações estruturais dos genes da β-globina

Alteração	Função afetada	Doença
Mutações pontuais	Dobramento da proteína	Doença falciforme
	Controle da transcrição	β-Talassemia
	Mutações de fase de leitura sem sentido	β-Talassemia
	Processamento de RNA	β-Talassemia
Deleção	Produção de mRNA	β^0-Talassemia Hemoglobina Lepore
Rearranjo	Produção de mRNA	β-Talassemia Tipo III

Uma análise semelhante poderia ser feita para várias outras doenças. As mutações pontuais são geralmente definidas pelo sequenciamento do gene em questão, embora ocasionalmente, se a mutação destrói ou cria um sítio de enzima de restrição, a técnica de análise do fragmento de restrição pode ser usada para apontar com precisão essa lesão. As deleções ou inserções do DNA, maiores do que 50 pb podem, com frequência, ser detectadas por procedimento de *Southern blotting*, enquanto os ensaios baseados em PCR podem detectar mudanças muito menores na estrutura do DNA.

Análise da genealogia

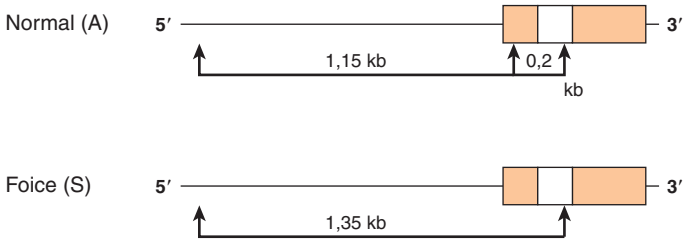
A doença falciforme novamente fornece um excelente exemplo de como a tecnologia do DNA recombinante pode ser aplicada para o estudo da doença humana. A substituição de T por A em uma fita-molde de DNA no gene da β-globina muda a sequência na região que corresponde ao sexto códon de

C C T G A G G Fita codificadora
G G A C Ⓣ C C Fita-molde

↓
C C T G T G G Fita codificadora
G G A C Ⓐ C C Fita-molde
↑

e destrói um sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *MstII* (CCTNAGG; destacado por pequenas setas verticais; Tabela 39-1). Outros sítios de *MstII* 5′ e 3′ a partir desse sítio **(Figura 39-9)** não são afetados e, portanto, serão cortados. Assim, a incubação do DNA de indivíduos normais (AA), heterozigotos (AS) e homozigotos (SS) resulta em três padrões diferentes na transferência *Southern blot* (Figura 39-9). Isto mostra como uma genealogia de DNA pode ser estabelecida utilizando os princípios discutidos neste capítulo. A análise da genealogia foi empregada para várias doenças genéticas, e é mais útil naquelas

A. Sítios de restrição *MstII* em torno e no gene da globina β



B. Análise de genealogia

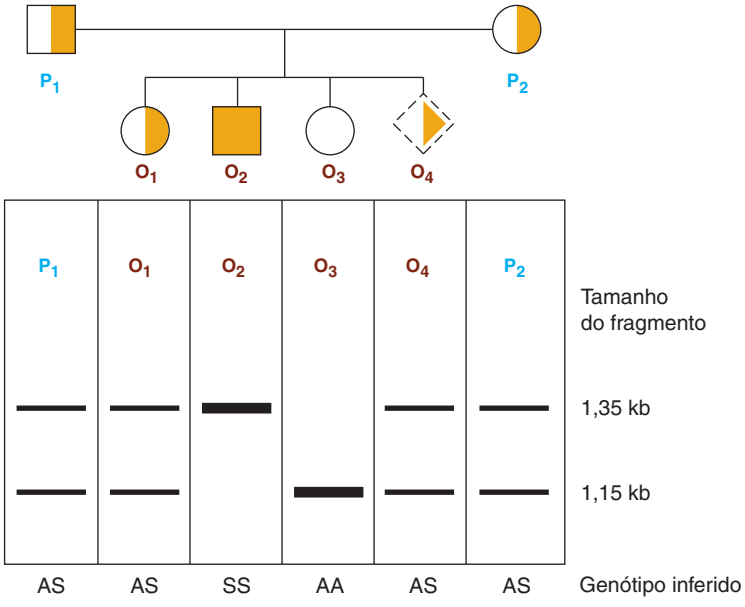


FIGURA 39-9 Análise de genealogia da doença falciforme. A parte de cima da figura (**A**) mostra a primeira parte do gene da β-globina e os sítios da enzima de restrição *MstII* nos genes da β-globina normal (A) e falciforme (S). A digestão com a enzima de restrição *MstII* resulta em fragmentos de DNA de 1,15 kb e 0,2 kb de comprimento em indivíduos normais. A mudança de T para A em indivíduos com doença falciforme elimina um dos três sítios de *MstII* em torno do gene da β-globina; portanto, um único fragmento de restrição de 1,35 kb de comprimento é gerado em resposta à *MstII*. Esta diferença de tamanho é facilmente detectada em um *Southern blot*. (O fragmento de 0,2 kb sairia para fora do gel nesta ilustração.) (**B**) A análise de genealogia mostra três possibilidades: AA = normal (círculo aberto); AS = heterozigoto (círculo metade cheio, quadrado metade cheio); SS = homozigotos (quadrado cheio). Esta abordagem permite o diagnóstico pré-natal da doença falciforme (quadrado com o contorno tracejado). Ver o texto.

causadas por deleções e inserções, ou nos raros casos em que o sítio de clivagem de uma endonuclease de restrição é afetado, como no exemplo citado aqui. Tais análises são facilitadas atualmente pela reação de PCR, que pode amplificar e, portanto, fornecer DNA suficiente para análise a partir de algumas poucas células nucleadas.

Diagnóstico pré-natal

Se a lesão genética é compreendida e uma sonda específica está disponível, o diagnóstico pré-natal é possível. O DNA de células coletadas de 10 mL de líquido amniótico (ou por biópsia de vilosidades coriônicas), pode ser analisado por transferência *Southern blot*. Um feto com o padrão de restrição AA na Figura 39-9 não apresenta doença falciforme e nem é um portador. Um feto com o padrão SS irá desenvolver a doença. Atualmente, estão disponíveis sondas para esse tipo de análise para muitas doenças genéticas.

Polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição e SNP

As diferenças na sequência de DNA citadas anteriormente podem resultar em variações dos sítios de restrição e, portanto, no comprimento dos fragmentos de restrição. Do mesmo modo, polimorfismos de nucleotídeo único, ou **SNP**, podem ser detectados pelo sensível método de PCR. Uma diferença herdada no padrão de digestão da enzima de restrição (p. ex., uma variação do DNA que ocorre em mais de 1% da população geral) é conhecida como **polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP**). Extensos mapas de RFPL e SNP do genoma humano foram construídos, os quais foram úteis no Projeto de Análise do Genoma Humano, sendo importantes componentes do esforço para compreender várias doenças de um único gene ou multigênicas. Os RFLP resultam de mudanças em uma única base (p. ex., doença falciforme) ou de deleções ou inserções (CNV) de DNA em um fragmento de restrição (p. ex., as talassemias), e revelaram-se úteis como ferramentas diagnósticas. Eles têm sido encontrados em *loci* de genes conhecidos e em sequências que não têm função conhecida; assim, os RFPL podem interromper a função do gene ou podem não apresentar consequências biológicas aparentes. Como mencionado anteriormente, 80% dos SNP no genoma de um único indivíduo conhecido já foram mapeados independentemente, por meio dos esforços do componente de mapeamento dos SNPs do Projeto Internacional HapMap.

Os RFLP e SNP são hereditários e se segregam de forma mendeliana. A principal utilização dos SNP/RFLP é na definição de doenças hereditárias em que o déficit funcional é desconhecido. Os SNP/RFLP podem ser usados para estabelecer os grupos de ligação, que pelo processo de ***chromosome walking***, irão definir, por fim, o *locus* da doença. Por esse processo **(Figura 39-10)**, um fragmento que representa uma extremidade de um longo pedaço de DNA é usado para isolar outro que se sobrepõe ao primeiro, mas que o estende. A direção da extensão é determinada pelo mapeamento de restrição, e o procedimento é repetido sequencialmente até que a sequência desejada seja obtida. Coleções de DNA mapeado do genoma humano clonado sobrepondo-se a BAC ou PAC estão disponíveis comercialmente. Os distúrbios ligados ao cromossomo X são particularmente sujeitos à abordagem de *chromosome walking*, uma vez que apenas um único alelo é expresso. Portanto, 20% dos RFLP definidos estão no cromossomo X, e um mapa de ligação completo (e sequência genômica) desse cromossomo foi definido. O gene do distúrbio ligado ao X, a distrofia muscular de Duchene, utiliza RFLP. Do mesmo modo, o defeito na doença de Huntington foi localizado na região terminal do braço curto do cromossomo 4, e o defeito que provoca a doença do rim policístico está ligado ao *locus* da α-globina no cromossomo 16.

Os polimorfismos do DNA microssatélite

Unidades de DNA repetidas em *tandem*, curtas (2 a 6 pb) e herdadas ocorrem cerca de 50.000 a 100.000 vezes no genoma humano (Capítulo 35). Como elas ocorrem mais frequentemente – e em vista da aplicação rotineira de métodos de PCR sensíveis – elas estão substituindo os RFLP como *loci* marcadores para várias pesquisas de genoma.

RFLP e VNTR na medicina forense

Números variáveis de unidades repetidas em *tandem* (VNTR) são um tipo comum de "inserção" que resulta em um RFLP. Os VNTR podem ser herdados, assim sendo úteis para estabelecer uma associação genética com uma doença em uma família ou entre parentes; ou eles podem ser característicos de um indivíduo e, assim, servir como uma impressão digital molecular daquela pessoa.

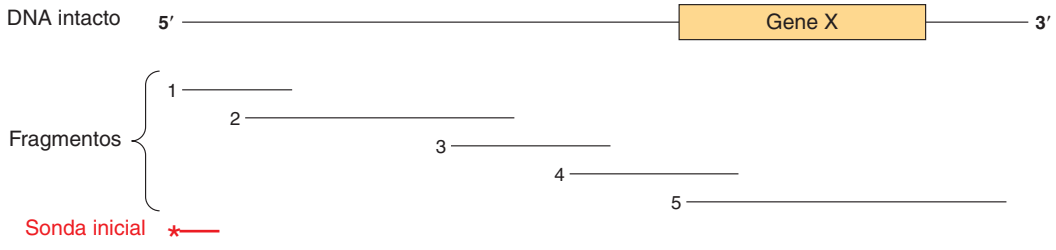


FIGURA 39-10 A técnica do *chromosome walking*. O gene X deve ser isolado de um grande pedaço de DNA. A localização exata desse gene não é conhecida, mas uma sonda (*——) direcionada contra um fragmento de DNA (mostrado na extremidade 5′ nesta representação) está disponível, bem como uma biblioteca de clones contendo uma série de fragmentos de inserção de DNA sobrepostos. A título de simplificação, apenas cinco desses são apresentados. A sonda inicial irá hibridizar apenas com clones contendo o fragmento 1, que pode então ser isolado e usado como uma sonda para detectar o fragmento 2. Este procedimento é repetido até que o fragmento 4 hibridiza com o fragmento 5, que contém a sequência inteira do gene X.

Sequenciamento direto de DNA genômico

Como observado anteriormente, os avanços recentes na tecnologia de sequenciamento do DNA, as assim chamadas plataformas de sequenciamento de nova geração (NGS), reduziram drasticamente o custo por base do sequenciamento de DNA. A sequência inicial do genoma humano custou aproximadamente US$350.000.000. O custo do sequenciamento do mesmo genoma humano diploide de 3×10^9 pb, utilizando as novas plataformas NGS, é estimado em $<$ 0,03% do original. Essa redução acentuada no custo estimulou várias iniciativas internacionais em sequenciar o genoma inteiro de milhares de indivíduos de várias origens raciais e étnicas para determinar a real extensão dos polimorfismos de DNA/genoma presentes no interior da população. A cornucópia de informação genética resultante e o custo cada vez menor do sequenciamento do DNA genômico estão aumentando drasticamente nossa capacidade de diagnosticar e, em última instância, de tratar as doenças humanas. Obviamente, quando o sequenciamento do genoma pessoal se tornar comum, irão acontecer mudanças acentuadas na prática médica porque as terapias serão, em última análise, individualizadas e adaptadas para a exata composição genética de cada indivíduo.

Terapia gênica e a biologia das células-tronco

As doenças causadas por deficiência do produto de um único gene (Tabela 39-4) são todas, teoricamente, sujeitas à terapia de substituição. A estratégia é clonar uma cópia normal do gene relevante (p. ex., o gene que codifica a adenosina desaminase) em um vetor que será facilmente absorvido e incorporado ao genoma de uma célula hospedeira. Células precursoras da medula óssea estão sendo investigadas com esse propósito porque elas, presumivelmente, irão se restabelecer e replicar na medula óssea. O gene introduzido começaria a dirigir a expressão do seu produto proteico e este seria capaz de corrigir a deficiência na célula hospedeira.

Como uma alternativa para "substituir" os genes defeituosos para curar doenças humanas, muitos cientistas estão investigando a viabilidade de identificar e caracterizar células-tronco pluripotentes que tenham a capacidade de se diferenciar em qualquer tipo celular no corpo humano. Resultados recentes nesse campo mostraram que células somáticas de humanos adultos podem ser convertidas prontamente em aparentes **células-tronco pluripotentes induzidas** (**iPSC**) por transfecção com cDNA que codificam um punhado de fatores de transcrição de ligação ao DNA. Esses e outros novos desenvolvimentos nos campos da terapia genética e da biologia de células-tronco prometem emocionantes novas terapias potenciais para a cura de doenças humanas.

Animais transgênicos

A terapia descrita anteriormente de substituição de genes da célula somática obviamente não seria passada para a prole. Outras estratégias para alterar as linhagens de células germinativas foram concebidas, mas foram testadas apenas em animais experimentais. Uma porcentagem dos genes injetados em um ovo fertilizado de camundongo será incorporada ao genoma e encontrada tanto em células somáticas quanto germinativas. Centenas de animais transgênicos foram criadas e são úteis para a análise dos efeitos específicos do tecido na expressão gênica e dos efeitos de superprodução dos produtos gênicos (p. ex., aqueles do gene do hormônio de crescimento ou dos oncogenes) e na descoberta de genes envolvidos no desenvolvimento – um processo que até agora tem sido difícil de ser estudado. A abordagem transgênica tem sido usada para corrigir uma deficiência genética em camundongos. Ovos fertilizados obtidos de camundongos com hipogonadismo genético foram injetados com DNA que contém a sequência codificadora da proteína precursora do hormônio de liberação de gonadotropina (GnRH). Esse gene foi expresso e regulado normalmente no hipotálamo de alguns camundongos resultantes, e estes animais eram todos de aspecto normal. Sua prole também não mostrou evidência de deficiência de GnRH. Esta é, portanto, a evidência de expressão da célula somática no transgene e de sua manutenção em células germinativas.

Interrupção do gene alvo ou *knockout*

Em animais transgênicos, adiciona-se uma ou mais cópias de um gene ao genoma, e não há como controlar onde o gene eventualmente se instala. Uma abordagem complementar – e muito mais difícil – envolve a remoção seletiva de um gene do genoma. Animais com gene *knockout* (geralmente camundongos) são produzidos por meio da criação de uma mutação que interrompe totalmente o funcionamento de um gene. Isso então pode ser usado para criar um animal transgênico heterozigoto. O cruzamento de dois desses animais irá, por meio da genética mendeliana, resultar em mutação homozigótica em 25% da prole. Milhares de cepas de camundongos com *knockouts* de genes específicos foram desenvolvidos. Técnicas para interromper os genes em células específicas, tecidos, ou órgãos foram desenvolvidas, chamadas de *knockouts* condicionais ou dirigidos. Isso pode ser conseguido por intermédio das combinações particulares do promotor-intensificador que direcionam a expressão de recombinases de DNA ou, alternativamente, a expressão de miRNA, ambas as quais inativam a expressão gênica. Esses métodos são particularmente úteis nos casos em que a ablação gênica durante o desenvolvimento inicial provoca a morte do embrião.

Perfil de proteína e RNA e mapeamento da interação proteína–DNA

A revolução "-ômica" da última década culminou na determinação das sequências de nucleotídeos de genomas inteiros, incluindo aqueles do brotamento e da divisão de leveduras, numerosas bactérias, mosca-da-fruta, o verme *Caenorhabditis elegans*, plantas, camundongo, rato, galinha, macaco e, principalmente, humanos. Genomas adicionais estão sendo sequenciados em ritmo acelerado. A disponibilidade de todas essas informações sobre sequência de DNA, acoplada aos avanços da engenharia genética, levou ao desenvolvimento de várias metodologias revolucionárias, a maioria das quais se baseia na **tecnologia de microarranjo de alta densidade ou plataformas NGS**. No caso dos microarranjos, é atualmente possível depositar milhares de sequências de DNA específicas, conhecidas e definidas (atualmente, são mais comuns oligonucleotídeos sintéticos) em uma lâmina de vidro de microscópio com poucos centímetros quadrados. Por meio do acoplamento de tais microarranjos de DNA à detecção altamente sensível de sondas de ácidos nucleicos hibridizadas, marcadas com fluorescência, derivadas de mRNA, os pesquisadores podem

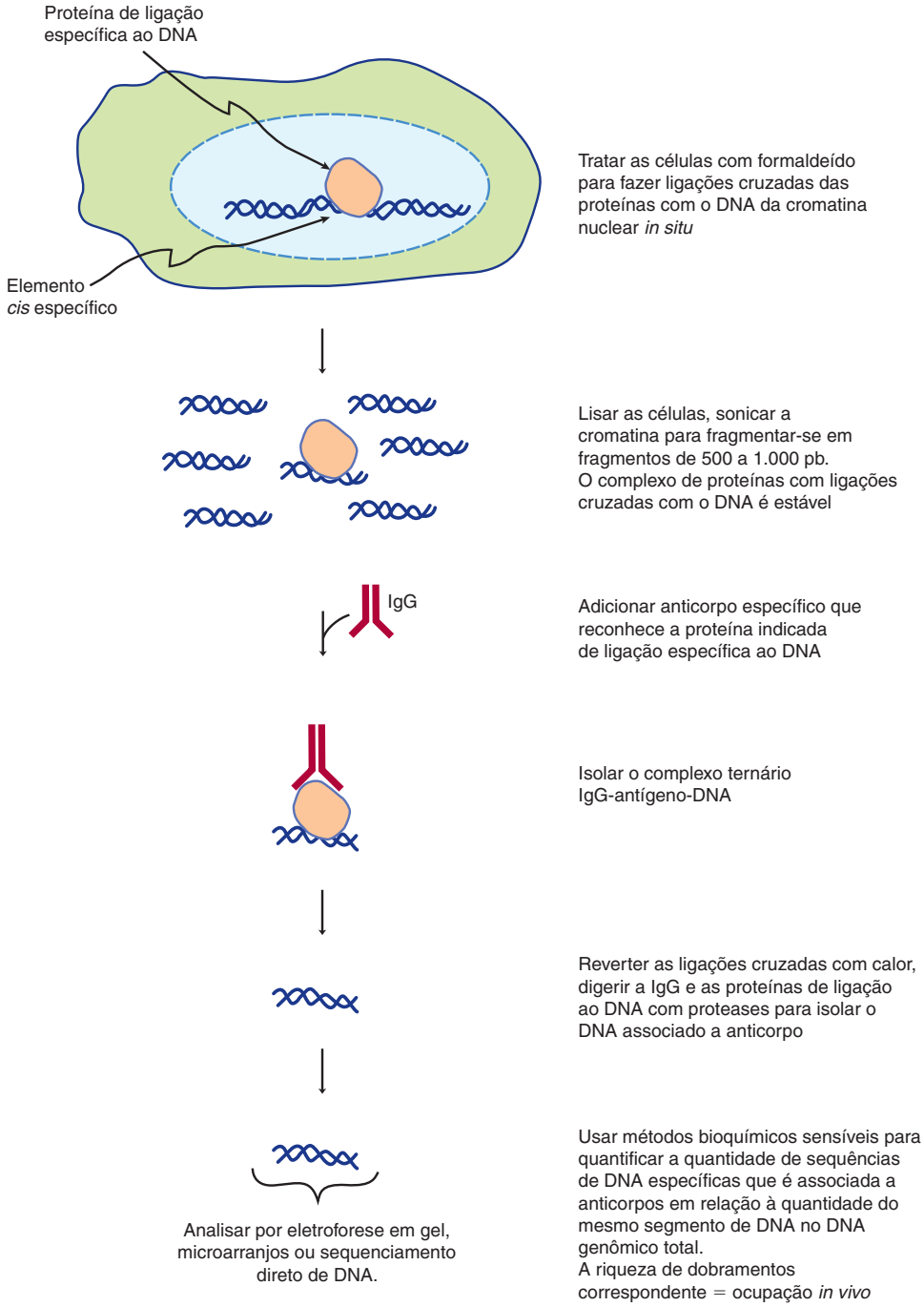


FIGURA 39-11 Esboço da técnica de imunoprecipitação (ChIP) de cromatina. Este método permite a localização precisa de uma proteína particular (ou proteína modificada se um anticorpo apropriado está disponível; p. ex., histonas fosforiladas ou acetiladas, fatores de transcrição, etc.) em um elemento de sequência particular em células vivas. Dependendo do método usado para analisar o DNA imunopurificado, alguma informação quantitativa ou semiquantitativa pode ser obtida, próxima do nível de resolução dos nucleotídeos. A ocupação proteína-DNA pode ser registrada em todo o genoma de duas maneiras. Primeiro pelo *chip* ChIP, um método que usa uma leitura de hibridização. No *chip* de ChIP, o DNA genômico total é marcado com um fluoróforo particular e o DNA imunopurificado é marcado com um fluoróforo espectralmente distinto. Esses DNAs marcados diferencialmente são misturados e hibridizados em "*chips*" de microarranjos (lâminas de microscópio) que contêm fragmentos de DNA específicos, ou mais comumente agora, oligonucleotídeos sintéticos com 50 a 70 nucleotídeos de comprimento. Esses oligonucleotídeos específicos dos genes são depositados e covalentemente ligados em coordenadas predeterminadas conhecidas X, Y, na lâmina. Os DNAs marcados são hibridizados, as lâminas lavadas e a hibridização para cada sonda de oligonucleotídeo registrada usando digitalização diferencial a *laser* e fotodetecção em resolução mícron. As intensidades dos sinais de hibridização são quantificadas e a razão de IP DNA/sinais de DNA genômico é usada para registrar os níveis de ocupação. O segundo método, chamado ChIP-seq, diretamente sequencia DNA imunopurificados usando NGS/métodos de sequenciamento profundo. Ambas as abordagens dependem de algoritmos bioinformáticos eficazes para lidar com os conjuntos de dados muito grandes que são gerados. As técnicas dos *chips* de ChIP e de ChIP-seq fornecem uma medida (semi) quantitativa da ocupação da proteína *in vivo*.

rapidamente e com precisão gerar perfis de expressão gênica (p. ex., conteúdo celular específico de mRNA) de amostras de células e tecidos tão pequenos quanto 1 g ou menos. Assim, a **informação do transcriptoma** completo (a coleção inteira de RNA celulares) para tais fontes de células ou tecidos pode rapidamente ser obtida em apenas poucos dias.

No caso do sequenciamento de NGS, os mRNAs são convertidos em cDNA usando a transcrição reversa, e esses cDNA são amplificados por PCR e sequenciados diretamente; este método é chamado de **RNA-Seq**. Métodos estão sendo desenvolvidos para permitir o sequenciamento direto do RNA eliminando a necessidade da etapa cDNA/PCR. Esses métodos permitem a descrição de todo o transcriptoma. Recentes avanços metodológicos (**GRO-Seq,** ***Global Run-On Sequecing*** e **NET-Seq,** ***native elongating transcript sequencing***) permitem o sequenciamento do RNA no interior dos complexos ternários de RNA-polimerase-DNA-RNA, permitindo, portanto, descrições no nível de nucleotídeos, de todo o genoma, da transcrição em células vivas. Tal informação do transcriptoma permite predizer quantitativamente a coleção de proteínas que devem ser expressas em uma célula, um tecido ou um órgão particular, em estados normais e de doença, baseada na presença de mRNA naquelas células. Complementando esse método de perfis de transcrição de alto rendimento, está o recente desenvolvimento de métodos para mapear a localização ou ocupação de proteínas específicas ligadas a sítios discretos no interior das células vivas. Esse método, ilustrado na **Figura 39-11**, é denominado **imunoprecipitação de cromatina** (**ChIP**). As proteínas sofrem ligações cruzadas *in situ* em células ou tecidos, a cromatina é isolada, cortada, e são obtidos complexos de DNA–proteína purificados específicos, utilizando anticorpos que reconhecem uma proteína em particular ou uma isoforma de proteína.

O DNA ligado a essa proteína é recuperado e analisado usando PCR e eletroforese em gel, sequenciamento direto (**ChIP-SEQ**) ou análise de microarranjo (**ChIP-*chip***). Ambos os métodos ChIP-SEQ e ChIP-*chip* permitem aos investigadores identificar locais na totalidade do genoma de uma única proteína ao longo de todos os cromossomos. O ChIP-SEQ permite mapear com resolução no nível de nucleotídeos. Finalmente, os métodos de alta sensibilidade e alto rendimento **espectrometria de massa de metabólitos** (**metabolômica**) **e amostras de proteínas complexas** (**proteômica**) foram desenvolvidos. Novos métodos de espectrometria de massa permitem identificar centenas ou milhares de proteínas em amostras extraídas de um número muito

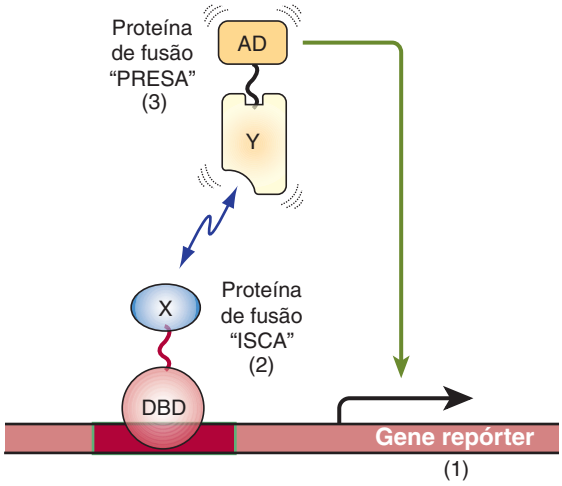


FIGURA 39-12 Resumo do sistema de duplo-híbrido para identificação e caracterização das interações proteína-proteína. São mostrados os componentes básicos e a operação do sistema de duplo-híbrido, desenvolvido originalmente por Fields e Song (Nature 340:245–246 [1989]) para funcionar no sistema de leveduras. (**1**) Um gene repórter ou um marcador seletivo (i.e., um gene conferindo crescimento prototrófico em meios seletivos, ou produzindo uma enzima para a qual existe um ensaio colorimétrico para a colônia, tal como a β-galactosidase) que é expresso apenas quando um fator de transcrição se liga acima do intensificador *cis*-ligado (barra vermelho escuro). (**2**) Uma proteína de fusão "isca" (*bait*, **DBD-X**) produzida a partir de um gene quimérico, expressando um domínio modular de ligação do DNA (**DBD**; frequentemente derivado de uma proteína Gal 4 de levedura ou da proteína bacteriana Lex A, ambas proteínas de ligação ao DNA de alta afinidade e alta especificidade) fusionada *in-frame* a uma proteína de interesse, neste caso, X. Em experimentos de duplo-híbrido, um está testando se qualquer proteína pode interagir com a proteína X. A proteína X presa (*prey*) pode se fusionar totalmente ou frequentemente, de modo alternativo, apenas uma porção dela é expressa *in-frame* com o DBD. (**3**) Uma proteína "presa" (*prey*, **Y-AD**), que representa uma fusão de uma proteína específica fusionada *in-frame* a um domínio de ativação transcricional (**AD**; frequentemente derivado da proteína VP16 do vírus do *Herpes simplex* ou da proteína Gal 4 da levedura). Esse sistema serve como um teste útil das interações proteína-proteína entre proteínas X e Y, porque na ausência de uma ligação transativadora funcional ao intensificador indicado não ocorre transcrição do gene repórter (i.e., ver Figura 38-16). Portanto, observa-se a transcrição apenas se ocorrem interações entre as proteínas X e Y, trazendo, assim, um AD funcional à unidade de transcrição *cis*-ligada, neste caso ativando a transcrição do gene repórter. Neste cenário, a proteína DBD-X sozinha é incapaz de ativar a transcrição do repórter porque o domínio X fusionado ao DBD não contém um AD. Do mesmo modo, uma proteína Y-AD sozinha não consegue ativar a transcrição do gene repórter porque ela não possui um DBD para direcionar a proteína Y-AD para o intensificador. Apenas quando ambas as proteínas estão expressas em uma única célula se ligam ao intensificador e, por meio de interações proteína-proteína DBD-X-Y-AD, regeneram uma "proteína" binária transativadora funcional, e a transcrição do gene repórter resulta na ativação e síntese de mRNA (linha de AD ao gene repórter).

pequeno de células (< 1g). Tais análises podem agora ser utilizadas para quantificar proteínas em duas amostras, bem como o nível de certos PTMs, como a fosforilação. Essas informações críticas indicam aos investigadores quais entre os muitos mRNA detectados nos estudos de mapeamento do transcriptoma são, na verdade, traduzidos em proteínas, geralmente o ditador final do fenótipo. Novos meios genéticos para a identificação das interações proteína-proteína e da função da proteína foram também concebidos.

O sistemático *knockdown* da expressão gênica de todo o genoma, utilizando SiRNA (miRNA) ou telas de interação genética letal sintética, foram empregadas para avaliar a contribuição de genes individuais a vários processos em sistemas modelo (leveduras, vermes e moscas) e células de mamíferos (humanas e de camundongos). Mapeamentos de redes específicas de interações proteína-proteína em todo o genoma foram identificados utilizando variantes de alto rendimento **teste de interação de duplo-híbrido** (**Figura 39-12**). Esse método simples, embora poderoso, pode ser realizado em células de bactérias, leveduras ou metazoários, e permite a detecção de interações específicas proteína-proteína em células vivas. Experimentos de reconstrução indicam que as interações proteína-proteína com afinidades de K_d de cerca de 1 μM, ou mais estreitas, podem ser facilmente detectadas por esse método. Em conjunto, essas tecnologias fornecem novas ferramentas poderosas para dissecar a complexidade da biologia humana.

Técnicas de microarranjo, sequenciamento de DNA de alto rendimento, hibridização dupla, *knockdown* genético e experimentos de identificação de proteínas e metabólitos por espectrometria de massa geraram grande quantidade de dados. O manejo e a interpretação adequada da grande quantidade de informação futura advinda desses estudos dependem de métodos estatísticos, e essa nova tecnologia, acoplada ao número de informações sobre as sequências de DNA, levou ao desenvolvimento dos campos da **bioinformática** (Capítulo 11) e da **biologia de sistemas**, novas disciplinas cujos objetivos são ajudar a gerenciar, analisar e integrar essa grande quantidade de informações importantes biologicamente. Trabalhos futuros na interseção entre a bioinformática, perfis de transcrição proteína/PTM e biologia de sistemas irão revolucionar a nossa compreensão sobre a fisiologia e a medicina.

RESUMO

- Uma variedade de técnicas muito sensíveis podem atualmente ser aplicadas para o isolamento e a caracterização de genes e para a quantificação de produtos gênicos.
- Na clonagem do DNA, um segmento particular de DNA é removido do seu meio normal utilizando o PCR ou uma das muitas endonucleases de restrição. Ele é, então, ligado a um vetor em que o segmento de DNA pode ser amplificado e produzido em abundância.
- O DNA sintetizado *in vitro* ou clonado pode ser usado como uma sonda e um dos vários tipos de reações de hibridização para detectar outras peças de DNA relacionadas ou adjacentes, ou pode ser usado para quantificar produtos gênicos tais como o mRNA.
- A manipulação do DNA para alterar a sua estrutura, a chamada engenharia genética, é um elemento essencial na clonagem (p. ex., a construção de moléculas quiméricas) e também pode ser usado para estudar a função de um certo fragmento de DNA e para analisar como os genes são regulados.
- Moléculas de DNA quimérico são introduzidas em células para fazer células transfectadas ou em oócitos fertilizados para fazer animais transgênicos.
- Técnicas que envolvem DNA sintético ou clonado são usadas para localizar genes para regiões específicas de cromossomos, identificar os genes responsáveis por doenças, estudar como a regulação defeituosa do gene provoca doenças, diagnosticar doenças genéticas e, progressivamente, tratar as doenças genéticas.

REFERÊNCIAS

Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, et al: Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. Science 2008;319:921.

Core LJ, Waterfall JJ, Lis JT: Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. Science 2008;322:1845–1848.

Churchman LS, Weissman JS: Nascent transcript sequencing visualizes transcription at nucleotide resolution. Nature 2011;469:368–373.

Friedman A, Perrimon N: Genome-wide high-throughput screens in functional genomics. Curr Opin Gen Dev 2004;14:470.

Gandhi TK, Zhong J, Mathivanan S, et al: Analysis of the human protein interactome and comparison with yeast, worm and fly interaction datasets. Nat Genet 2006;38:285.

Gerstein MB, Lu ZJ, Van Nostrand EL, et al: Integrative analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome by the modENCODE project. Science 2010;330:1775–1787.

Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, et al: Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. Science 2010;329:52–56.

Gilchrist DA, Fargo DC, Adelman K: Using ChIP-chip and ChIP-seq to study the regulation of gene expression: genome-wide localization studies reveal widespread regulation of transcription elongation. Methods 2009;48:398–408.

Isaacs FJ, Carr PA, Wang HH, et al: Precise manipulation of chromosomes in vivo enables genome-wide codon replacement. Science. 2011;333:348–353.

Kodzius R, Kojima M, Nishiyori H, et al: CAGE: cap analysis of gene expression. Nat Meth 2006;3:211–222.

Martin JB, Gusella JF: Huntington's disease: pathogenesis and management. N Engl J Med 1986;315:1267.

Myers RM, Stamatoyannopoulos J, Snyder M, et al: A user's guide to the encyclopedia of DNA elements (ENCODE). PLoS Biol. 2011;9:e1001046.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Schlabach MR, Luo J, Solimini NL, et al: Cancer proliferation gene discovery through functional genomics. Science 2008;319:620.

Suter B, Kittanakom S, Stagljar I: Interactive proteomics: what lies ahead? Biotechniques 2008;44:681.

Spector DL, Goldman RD, Leinwand LA: *Cells: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.
Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 2007;131:861.
The ENCODE Project Consortium: Identification and analysis of functional in 1% of the human genome by the ENCODE Pilot Project. Nature 2007;447:799.
Watson JD, Gilman M, Witkowski JA, et al: *Recombinant DNA,* 2nd ed. Scientific American Books. Freeman, 1992.
Weatherall DJ: *The New Genetics and Clinical Practice,* 3rd ed. Oxford University Press, 1991.
Wernig M, Meissner A, Foreman R, et al: In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. Nature 2007;448:318.
Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, et al: The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. Nature 2008;451:872.
Wold B, Myers RM: Sequence census methods for functional genomics. Nat Meth 2008;5:19.

GLOSSÁRIO

ARS: sequência de replicação autônoma; a origem da replicação em leveduras.
Autorradiografia: a detecção de moléculas radiativas (p. ex., DNA, RNA e proteína) por meio da visualização de seus efeitos em um filme fotográfico ou de raio X.
Bacteriófago: um vírus que infecta uma bactéria.
Biblioteca: uma coleção de fragmentos clonados que representam, em grupos, o genoma completo. As bibliotecas podem ser de DNA genômico (nas quais tanto íntrons quanto éxons são representados) ou de cDNA (nas quais apenas os éxons são representados).
CAGE: análise do capuz da expressão gênica. Um método que permite a captura seletiva, a amplificação, a clonagem e o sequenciamento dos mRNA por meio da estrutura capuz 5′.
cDNA: molécula de fita simples de DNA que é complementar a uma molécula de mRNA e é sintetizada a partir deste pela ação da transcriptase reversa.
Clone: um grande número de organismos, células ou moléculas que são idênticos a um único organismo, célula ou molécula parental.
Código epigenético: os padrões de modificação do DNA cromossomal (i.e., metilação da citosina) e as modificações pós-tradução da histona nucleossomal. Estas alterações no *status* de modificação podem levar a alterações drásticas na expressão gênica. Notavelmente, no entanto, a sequência de DNA subjacente efetivamente envolvida não se altera.
Cosmídeo: um plasmídeo em que as sequências de DNA do bacteriófago lambda que são necessárias para o acondicionamento do DNA (sítios cos) foram inseridas; isto permite que o plasmídeo de DNA seja acondicionado *in vitro*.
DNA de extremidade cega: duas fitas de um DNA dúplex com extremidades alinhadas entre si.
DNA de terminação adesiva: Fitas simples complementares de DNA que se projetam a partir de extremidades opostas de um dúplex de DNA ou das extremidades de moléculas duplas diferentes (ver também DNA de extremidade cega).
DNA recombinante: o DNA alterado que resulta da inserção de uma sequência de desoxinucleotídeos não encontrados previamente em uma molécula de DNA existente por meios enzimáticos ou químicos.
Endonuclease: uma enzima que cliva ligações internas no DNA ou RNA.
Enzima de restrição: uma endodesoxinuclease que provoca a clivagem de ambas as fitas de DNA em sítios altamente específicos determinados pela sequência de bases.
Excinuclease: a nuclease de excisão envolvida no reparo por troca de nucleotídeos de DNA.
Exoma: a sequência de nucleotídeos de todo o complemento dos éxons de mRNA expressos em uma célula, tecido, órgão ou organismo particular. O exoma difere do transcriptoma que representa a coleção inteira dos transcritos do genoma; o exoma representa um subconjunto de sequências de RNA que compõe o transcriptoma.
Éxon: a sequência de um gene que é representado (expresso) como mRNA.
Exonuclease: uma enzima que cliva nucleotídeos de extremidades 3′ e 5′ de DNA ou RNA.
Fingerprinting: o uso de RFLPs ou sequências repetidas de DNA para estabelecer um padrão único de fragmentos de DNA para um indivíduo.
FISH: hibridização *in situ* com fluorescência, um método usado para mapear a localização de sequências específicas de DNA no interior de núcleos fixos.
Footprinting: o DNA com proteína ligada é resistente à digestão pelas enzimas DNAses. Quando uma reação de sequenciamento é realizada utilizando esse DNA, uma área protegida, que representa a "pegada" (*footprint*) da proteína ligada, será detectada, porque as nucleases são incapazes de clivar o DNA diretamente ligado pela proteína.
Grampo (*Hairpin*): um trecho da dupla-hélice formado pelo pareamento de bases entre as sequências complementares próximas de uma fita simples de DNA ou RNA.
GRO-Seq, *Global Run-On Sequencing*: método em que os transcritos nascentes são especificamente capturados e sequenciados usando NGS/sequenciamento profundo. Esse método permite o mapeamento da localização de complexos de transcrição ativos.
Hibridização: a reassociação específica de fitas complementares de ácidos nucleicos (DNA com DNA, DNA com RNA ou RNA com RNA).
Imunoprecipitação de Cromatina, ChIP: uma técnica para a determinação da localização exata de uma proteína particular ou isoforma de proteína, ou qualquer localização genômica particular em uma célula viva. O método é baseado nas ligações cruzadas (*cross-linking*) de células vivas, interrupção celular, fragmentação do DNA e imunoprecipitação com anticorpos específicos que purificam o cognato de proteína que realiza ligações cruzadas com o DNA. As ligações cruzadas são revertidas, os DNAs associados purificados e sequências específicas, que são purificadas, são medidas utilizando-se qualquer um de vários métodos diferentes.
Imunoprecipitação de cromatina de ensaio por meio de leitura de hibridização com um *chip* de microarranjo – ChIP: um método baseado em hibridização que utiliza as técnicas de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) para mapear em todo o genoma os sítios de ligação *in vivo* de proteínas específicas no interior da cromatina de células vivas. A ligação da sequência é determinada pela renaturação de amostras de DNA marcado fluorescentemente com microarranjos (arranjo).
Imunoprecipitação de cromatina de ensaio por meio de um NGS/ leitura de sequenciamento profundo: local de ligação do DNA genômico em um ChIP determinado por alto rendimento profundo/sequenciamento, em vez de hibridização com microarranjos.
Inserção: um comprimento adicional de pares de bases no DNA, geralmente introduzido por técnicas da tecnologia do DNA recombinante.
Íntron: a sequência de um gene que codifica mRNA que é transcrito, porém retirado antes da tradução. Os genes de tRNA também contêm íntrons.
Ligação: a união de dois trechos do DNA ou RNA em um único trecho, catalisada por enzima na ligação fosfodiéster; as enzimas respectivas são DNA e RNA ligases.
Lines: longas sequências de repetição intercaladas.
miRNA: microRNA, espécies de RNA de 21 a 22 nucleotídeos derivadas de unidades de transcrição da RNA-polimerase II, e de 500 a 1.500 pb de comprimento, pelo processamento de RNA. Esses RNAs, recentemente descobertos, desempenham papéis cruciais na regulação gênica.

Molécula quimérica: uma molécula (p. ex., DNA, RNA e proteína) que contém sequências derivadas de duas espécies diferentes.

NET-seq, *native elongating sequencing*: análise de todo o genoma das extremidades 3′ das cadeias nascentes de mRNA de eucariotos mapeadas no nível de resolução de nucleotídeos. Os complexos de alongamento da RNA-polimerase II são capturados por imunopurificação com IgG antipol II e os RNAs nascentes que contêm um grupo 3′OH livre são marcados pela ligação com um *linker* de RNA e subsequentemente amplificados por PCR e submetidos a sequenciamento profundo.

Northern blot: um método para a transferência de RNA de um gel de agarose ou de poliacrilamida para um filtro de nitrocelulose em que o RNA pode ser detectado por uma sonda adequada.

Oligonucleotídeo: uma sequência definida de nucleotídeos curtos unida em uma ligação fosfodiéster característica.

Ori: a origem da replicação do DNA.

PAC: um vetor de clonagem de alta capacidade (70 a 95 kb) baseado no bacteriófago lítico de *E. coli* P1 que replica em bactérias como um elemento extracromossomal.

Palíndromo: uma sequência de DNA duplo que é a mesma quando as duas fitas são lidas em direções opostas.

PCR-RT: um método utilizado para quantificar os níveis de mRNA que depende de uma primeira etapa de cópia de cDNA de mRNA catalisada pela transcriptase reversa antes da amplificação e quantificação pelo PCR.

Plasmídeo: uma molécula de DNA pequena, circular e extracromossomal que replica independentemente do DNA hospedeiro.

Polimorfismo microssatélite: heterozigosidade de um determinado microssatélite de repetição em um indivíduo.

Primossomo: o complexo móvel de helicase e primase que está envolvido na replicação do DNA.

Proteoma: a coleção completa de proteínas expressas em um organismo.

Projeto ENCODE: projeto de enciclopédia de elementos do DNA; um esforço de vários laboratórios do mundo para fornecer uma detalhada representação bioquímica informativa do genoma humano usando métodos de sequenciamento de alto rendimento para identificar e catalogar os elementos funcionais no interior de uma única porção restrita (cerca de 1%; 30.000.000 pb) de um cromossomo humano.

Pseudogene: um segmento inativo de DNA que surge por mutação de um gene ativo parental; geralmente gerado por transposição de uma cópia de cDNA de um mRNA.

Reação em cadeia da polimerase (PCR): um método enzimático para a cópia repetida (e, portanto, a amplificação) das duas fitas de DNA que compõem uma sequência gênica particular.

RNA-Seq: um método em que populações de RNA celular são convertidas por meio de ligação *linker* e PCR em cDNA que são, então, submetidas ao sequenciamento profundo para determinar a sequência completa de essencialmente todos os RNA na preparação.

Sequências de repetição microssatélites: sequências de repetição dispersas ou agrupadas de 2 a 5 pb repetidas até 50 vezes. Podem ocorrer em 50 a 100 mil locais no genoma.

Sinal: o produto final observado quando uma sequência específica de DNA ou RNA é detectada por autorradiografia ou algum outro método. A hibridização com um polinucleotídeo radioativo complementar (p. ex., por *Southern* ou *Northern blotting*) é comumente usada para gerar o sinal.

Sines: sequências de repetição curtas intercaladas.

siRNA: RNA silenciadores, de 21 a 25 nt de comprimento, gerados por degradação nucleolítica seletiva de RNA de fita dupla, de origem celular ou viral. Os RNASi se unem a vários sítios específicos no alvo em RNAs que levam à degradação de mRNA e, portanto, ao "desligamento" (*knockdown*) do gene.

SNP: polimorfismo de um único nucleotídeo. Refere-se ao fato de que a variação genética de um único nucleotídeo na sequência genômica ocorre em *loci* discretos ao longo dos cromossomos. A medida das diferenças de alélicas de SNP é útil para os estudos de mapeamento genético.

snRNA: RNA nuclear pequeno. Essa família de RNA é melhor conhecida por seu papel no processamento do mRNA.

Sonda: uma molécula utilizada para detectar a presença de um fragmento específico de DNA ou RNA em, por exemplo, uma colônia bacteriana que é formada a partir de uma biblioteca genômica ou durante a análise das técnicas de transferência *blot*; sondas comuns são moléculas de cDNA, oligodesoxinucleotídeos sintéticos de sequência definida ou anticorpos para proteínas específicas.

Southern blot: um método de transferência de DNA de um gel de agarose para um filtro de nitrocelulose no qual o DNA pode ser detectado por uma sonda própria (p. ex., DNA ou RNA complementares).

Southwestern blot: um método para detecção de interações proteína-DNA pela aplicação de uma sonda de DNA marcada para uma membrana de transferência que contém uma proteína renaturada.

Spliceossomo: o complexo macromolecular responsável pelo *splicing* do mRNA precursor. O spliceossomo é composto por pelo menos cinco pequenos RNAs nucleares (snRNA; U1, U2, U4, U5 e U6) e muitas proteínas.

Splicing: a remoção dos íntrons do RNA acompanhada pela junção aos seus éxons.

Tandem: usado para descrever cópias múltiplas da mesma sequência (p. ex., DNA) que estão adjacentes uma à outra.

Transferase terminal: uma enzima que adiciona nucleotídeos de um tipo (p. ex., resíduos de desoxiadenonucleotidil) à extremidade 3′ das fitas de DNA.

Transcrição: síntese de ácidos nucleicos direcionada pelo molde de DNA, geralmente a síntese de RNA direcionada por DNA.

Transcriptomo: coleção completa de RNA expressos em uma célula, um tecido, um órgão ou um organismo.

Transgênico: descreve a introdução de um novo DNA em células germinativas por sua injeção no núcleo do óvulo.

Tradução: síntese de proteína que utiliza o mRNA como molde.

Tradução de cadeia com quebras: técnica para marcação do DNA baseada na capacidade da DNA-polimerase de *E. coli.* degradar uma fita de DNA que foi cortada e, em seguida, ressintetizar a fita; se um nucleosídeo trifosfato radioativo for empregado, a fita reconstituída se torna marcada e pode ser usada como uma sonda radiativa.

Transcrição reversa: síntese direcionada de DNA pelo RNA catalisada pela transcriptase reversa.

Variação no número de cópias (CNV): alteração no número de cópias de regiões genômicas específicas do DNA entre dois ou mais indivíduos. As CNV podem ser tão grandes quanto 10^6 pb de DNA e incluir deleções ou inserções.

Vetor: um plasmídeo ou bacteriófago em que DNA estranho pode ser introduzido com objetivo de clonagem.

Western blot: um método para transferir proteína para um filtro de nitrocelulose, no qual a proteína pode ser detectada por uma sonda adequada (p. ex., um anticorpo).

Questões para Estudo

Seção IV

1. Qual das seguintes afirmações sobre os derivados β,γ-metileno e os β,γ-imino de trifosfatos de purina e pirimidina está CORRETA?
   A. Eles são fármacos anticancerígenos potenciais.
   B. Eles são precursores de vitaminas B.
   C. Eles prontamente passam por remoção hidrolítica do terminal fosfato.
   D. Eles podem ser usados para implicar o envolvimento de nucleotídeos trifosfato por meio de outros efeitos além da transferência de fosforila.
   E. Eles servem como precursores de polinucleotídeos.

2. Qual das seguintes afirmações sobre as estruturas dos nucleotídeos NÃO ESTÁ CORRETA?
   A. Os nucleotídeos são ácidos polifuncionais.
   B. A cafeína e a teobromina diferem estruturalmente apenas em relação ao número de grupos metila ligados aos seus anéis de nitrogênio.
   C. Os átomos da porção do anel de purina das pirimidinas são numerados na mesma direção que aqueles de uma pirimidina.
   D. NAD^+, FMN, "metionina ativa" e coenzima A são todos derivados de ribonucleotídeos.
   E. Os 3′, 5′ – AMP e GMP cíclicos (AMPc e GMPc) servem como mensageiros secundários na bioquímica humana.

3. Qual das seguintes afirmações sobre o metabolismo dos nucleotídeos purinas NÃO ESTÁ CORRETA?
   A. Uma etapa inicial na biossíntese de purinas é a formação do PRPP (fosforibosil-1-pirofosfato).
   B. A inosina monofosfato (IMP) é um precursor tanto de AMP quanto de GMP.
   C. O ácido orótico é um intermediário na biossíntese de nucleotídeos pirimidinas.
   D. Seres humanos catabolizam uridina e pseudouridina por reações análogas.
   E. A ribonucleotídeo redutase converte nucleosídeos difosfato aos desoxiribonucleosídeos difosfato correspondentes.

4. Qual das seguintes afirmações a seguir NÃO ESTÁ CORRETA?
   A. Distúrbios metabólicos são apenas infrequentemente associados a defeitos no catabolismo de purinas.
   B. Disfunções imunes estão associadas tanto a uma adenosina-desaminase defeituosa quanto a uma fosforilase de nucleosídeo purina defeituosa.
   C. A síndrome de Lesch–Nyhan reflete um defeito na transferase do fosforibosil hipoxantina-guanina.
   D. A litíase xântica pode se dever a um defeito severo na xantina-oxidase.
   E. A hiperuricemia pode resultar de condições tais como câncer caracterizado por reposição tecidual estimulada.

5. Qual dos seguintes componentes é encontrado no DNA?
   A. Um grupo fosfato, adenina e ribose.
   B. Um grupo fosfato, guanina e desoxirribose.
   C. Citosina e ribose.
   D. Timina e desoxirribose.
   E. Um grupo fosfato e adenina.

6. O esqueleto de uma molécula de DNA é composto por qual das moléculas a seguir?
   A. Açúcares e bases nitrogenadas alternados.
   B. Apenas bases nitrogenadas.
   C. Apenas grupos fosfato.
   D. Grupos fosfato e açúcares alternados.
   E. Apenas açúcares de cinco carbonos.

7. Ligações de interconexão que conectam os nucleotídeos de RNA e DNA são chamadas de:
   A. Ligações *N*-glicosídicas.
   B. Ligações fosfodiéster 3′-5′ em cadeia.
   C. Fosfomonoésteres.
   D. Ligações de fosfodiéster 3′-2′ em cadeia.
   E. Ligações peptídicas de ácidos nucleicos.

8. Qual componente do dúplex de DNA leva a molécula a ter uma carga negativa final no pH fisiológico?
   A. Desoxirribose
   B. Ribose
   C. Grupos fosfato
   D. Íon cloro
   E. Adenina

9. Qual característica molecular listada leva o dúplex de DNA a exibir uma largura aproximadamente constante ao longo do seu eixo longo?
   A. Uma base nitrogenada purina sempre pareia com outra base nitrogenada purina.
   B. Uma base nitrogenada pirimidina sempre pareia com outra base nitrogenada pirimidina.
   C. Uma base nitrogenada pirimidina sempre pareia com uma base nitrogenada purina.
   D. Repulsão entre os grupos fosfatos mantém as fitas separadas por uma distância uniforme.
   E. Atração entre os grupos fosfatos mantém as fitas separadas por uma distância uniforme.

10. O modelo para a replicação do DNA proposto primeiro por Watson e Crick postulava que toda molécula de DNA filha dúplex de fita dupla recém replicada
    A. era composta de duas fitas da molécula de DNA parental.
    B. continha apenas as duas fitas recém-sintetizadas de DNA.
    C. continha duas fitas que são misturas aleatórias de novo e velho DNA no interior de cada fita.
    D. era composta de uma fita derivada do DNA dúplex parental original e de uma fita que era recém-sintetizada.
    E. era composta por sequências de nucleotídeos completamente distintos de qualquer uma das fitas de DNA parental.

11. Nomeie o mecanismo pelo qual os RNAs são sintetizados a partir do DNA.
    A. Duplicação replicacional
    B. Tradução
    C. Reparo translesão
    D. Transesterificação
    E. Transcrição

12. Qual das forças ou interações listadas a seguir desempenha um papel predominante guiando a formação da estrutura secundária e terciária do RNA?
    A. Repulsão hidrofílica
    B. Formação de regiões de pares de bases complementares
    C. Interação hidrofóbica
    D. Interações de van der Waals
    E. Formação de pontes salinas

13. Nomeie a enzima que sintetiza RNA a partir de um molde de DNA de fita dupla.
    A. RNA-polimerase dependente de RNA
    B. RNA-convertase dependente de DNA
    C. Replicase dependente de RNA
    D. RNA-polimerase dependente de DNA
    E. Transcriptase reversa

14. Defina a diferença característica mais marcante em relação à expressão gênica entre eucariotos e procariotos.
    A. Comprimentos dos nucleotídeos dos RNA ribossomais
    B. Mitocôndrias
    C. Lisossomos e peroxissomos
    D. Sequestro do material genômico no núcleo
    E. Clorofila

15. Qual opção a seguir descreve corretamente o número aproximado de pares de bases de DNA_____, que é separado em _____ cromossomos em uma típica célula humana diploide em um estado de não replicação?
    A. 64 bilhões, 23
    B. 6,4 trilhões, 46
    C. 23 bilhões, 64
    D. 64 bilhões, 46
    E. 6,4 bilhões, 46

16. Qual é o número aproximado de pares de bases associadas a um único nucleossomo?
    A. 146
    B. 292
    C. 73
    D. 1.460
    E. 900

17. Todas as histonas a seguir, exceto uma, se localizam no interior da super-hélice formada entre o DNA e o octâmero de histonas; essa histona é a
    A. histona H2B
    B. histona H3
    C. histona H1
    D. histona H3
    E. histona H4

18. A cromatina pode ser amplamente definida como ativa e reprimida; uma subclasse de cromatina que é especificamente inativada em certos momentos da vida de um organismo e/ou em subconjuntos particulares de células diferenciadas é chamada de
    A. eucromatina constitutiva
    B. heterocromatina facultativa
    C. eucromatina
    D. heterocromatina constitutiva

19. Qual das seguintes afirmações levanta a hipótese de que o estado físico e funcional de uma certa região da cromatina genômica seja dependente dos padrões de modificações pós-tradução (PTMs) específicas de histonas e/ou do estado de metilação do DNA?
    A. Código Morse
    B. Hipótese PTM
    C. Hipótese do corpo nuclear
    D. Código epigenético
    E. Código genético

20. Qual o nome do trecho de DNA repetido incomum localizado nas pontas de todos os cromossomos eucarióticos?
    A. Cinetócoro
    B. Telômero
    C. Centríolo
    D. Cromômero
    E. Micrômero

21. Uma vez que as DNA-polimerases não são capazes de sintetizar DNA sem um *primer*, qual molécula serve como o *primer* para essas enzimas durante a replicação do DNA?
    A. Açúcares de cinco carbonos
    B. Apenas desoxirribose
    C. Uma pequena molécula de RNA
    D. Proteínas com grupos hidroxila livres
    E. Fosfomonoéster

22. A replicação descontínua do DNA que ocorre durante a replicação é catalisada pela produção de pequenos segmentos de DNA chamados de
    A. Fragmentos de Okazaki
    B. Pedaços de Toshihiro
    C. Oligonucleotídeos Onishi
    D. Fitas de Crick
    E. Fragmentos de Watson

23. Qual molécula ou força fornece a energia que conduz a liberação da tensão mecânica da DNA-girase?
    A. Conversão de pirimidina à purina
    B. Hidrólise de GTP
    C. Hidrólise de ATP
    D. Glicólise
    E. Uma molécula ou força gradiente de prótons

24. Qual o nome da fase do ciclo celular entre o fim da divisão celular e o início da síntese de DNA?
    A. G_1
    B. S
    C. G_2
    D. M
    E. G_0

25. Em qual estágio do ciclo celular são ativadas as proteínas-chave quinases, como a quinase dependente de ciclina?
    A. Logo antes da mitose
    B. No início da fase S

C. Perto do final da fase G_1
D. No final da fase G_2
E. Todas as respostas acima

26. Qual doença é frequentemente associada à destruição da capacidade de uma célula de regular/controlar sua própria divisão?
A. Doença renal
B. Câncer
C. Enfisema
D. Diabetes
E. Doença cardíaca

27. Qual mecanismo molecular é responsável pela diminuição rápida da atividade de Cdk que leva à saída da fase M e entrada na fase G_1?
A. Queda na concentração de ciclina mitótica
B. Diminuição na concentração da ciclina em G_1
C. Aumento na concentração de ciclina em G_2
D. Aumento na concentração de ciclina mitótica
E. Aumento na concentração de ciclina em G_1

28. O sítio ao qual a RNA-polimerase se liga no molde de DNA antes do início da transcrição:
A. Junção íntron/éxon
B. Fase de leitura aberta de DNA, o terminador
C. Terminador
D. Códon iniciador metionina
E. Promotor

29. Os grandes genes de rRNA de eucariotos, tais como os genes codificadores dos RNAs 18S e 28S são transcritos por qual das seguintes RNA-polimerases?
A. RNA-polimerase III
B. RNA-polimerase δ dependente de RNA
C. RNA-polimerase I
D. RNA-polimerase II
E. RNA-polimerase mitocondrial

30. Todas as RNA-polimerases de eucariotos têm a necessidade de uma grande variedade de proteínas acessórias para possibilitar sua ligação a promotores e a formação de complexos de transcrição fisiologicamente relevantes; essas proteínas são chamadas de
A. fatores de transcrição geral ou basal
B. ativadores
C. fatores acessórios
D. fatores de alongamento
E. polipeptídeos facilitadores

31. O segmento de DNA do qual o transcrito primário é copiado ou transcrito é chamado de
A. região codificadora
B. domínio iniciador de metionina
C. unidade de tradução
D. transcriptoma
E. códon inicial

32. Qual tipo de DNA são os cístrons de rDNA eucariótico?
A. DNA de cópia única
B. DNA altamente repetitivo
C. DNA moderadamente repetitivo
D. DNA de sequência mista

33. As modificações dos nucleotídeos dos pré-tRNA, pré-rRNA e pré-mRNA ocorrem
A. pós-prandialmente
B. pós-mitoticamente
C. pré-transcricionalmente
D. pós-transcricionalmente
E. prematuramente

34. Os promotores da RNA-polimerase II estão localizados de qual lado da unidade de transcrição?
A. Interno
B. 3′
C. O mais próximo do terminal C
D. O mais próximo do terminal N
E. 5′

35. Em relação aos mRNAs de eucariotos, uma das afirmações a seguir não é uma propriedade normal dos mRNAs.
A. Os mRNAs de eucariotos têm modificações especiais nos seus terminais 5′ (capuz) e 3′ (cauda de poli A).
B. São ligados aos ribossomos quando são traduzidos.
C. São encontrados no citoplasma no interior dos peroxissomos.
D. A maioria tem um segmento não codificador significativo que não direciona a montagem dos aminoácidos.
E. Contêm sequências de nucleotídeos contínuas que codificam um polipeptídeo particular.

36. A ligação que conecta o nucleotídeo de iniciação do mRNA com a estrutura de revestimento 5^{me}-G é uma
A. ponte fosfodiéster 3′-5′
B. ponte trifosfato 5′-5′
C. ponte trifosfato 3′-3′
D. ponte trifosfato 3′-5′
E. ponte trifosfato 5′-3′

37. Qual sequência característica dos mRNAs maduros listados a seguir protegem os mRNAs da degradação?
A. Modificações pós-tradução especiais
B. Cauda de poli$(C)_n$ 3′
C. Capuz 5^{me}-G
D. Íntrons
E. Estruturas em laço

38. Quais seriam as consequências de *splicing* de mRNA impreciso para o RNA?
A. Um erro de base única na junção do *splicing* causaria uma grande deleção.
B. Um erro de base única na junção do *splicing* causaria uma grande inserção.
C. Um erro de base única na junção do *splicing* causaria uma grande inversão.
D. C e E.
E. Um erro de base única na junção do *splicing* mudaria a fase de leitura e resultaria na tradução errada do mRNA.

39. Qual é o complexo macromolecular que se associa aos íntrons durante o *splicing* do mRNA?
A. *Splicer*
B. *Dicer*
C. Corpo nuclear
D. Spliceossomo
E. *Slicer*

40. Qual reação a transcriptase reversa catalisa?
    A. Tradução do RNA para DNA.
    B. Transcrição do DNA para RNA.
    C. Conversão dos ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos.
    D. Transcrição do RNA para DNA.
    E. Conversão de um ribonucleotídeo em desoxirribonucleotídeos no DNA de dupla-hélice.

41. RNAi ou a interferência de RNA mediada por dsRNA serve de mediador para
    A. ligação do RNA
    B. silenciamento do RNA
    C. inversão do RNA
    D. restauração do RNA
    E. supressão do RNA

42. Enquanto o código genético tem 64 códons, há apenas 20 aminoácidos ocorrendo naturalmente. Consequentemente, alguns aminoácidos são codificados por mais de um códon. Essa característica do código genético é uma ilustração de que o código genético é
    A. degenerado
    B. duplicado
    C. não sobreposto
    D. sobreposto
    E. redundante

43. O código genético contém quantoscódons de terminação?
    A. 3
    B. 21
    C. 61
    D. 64
    E. 20

44. Se um tRNA tem a sequência 5′-CAU-3′, qual códon ele reconheceria (ignore pareamento de bases incorreto).
    A. 3′-UAC-5′
    B. 3′-AUG-5′
    C. 5′-ATG-3′
    D. 5′-AUC-3′
    E. 5′-AUG-3′

45. O que está na extremidade 3′ de todos os tRNA maduros funcionais?
    A. A alça da folha do trevo
    B. O anticódon
    C. A sequência CCA
    D. O códon

46. A maioria das aminoacil-tRNA sintetases possui uma atividade que é compartilhada com as DNA-polimerases. Esta atividade é uma função
    A. revisora
    B. de hidrólise
    C. proteolítica
    D. helicase
    E. endonucleolítica

47. As três fases distintas da síntese proteica, na ordem CORRETA são
    A. iniciação, terminação, alongamento
    B. terminação, iniciação, alongamento
    C. iniciação, alongamento, terminação
    D. alongamento, iniciação, terminação
    E. alongamento, terminação, iniciação

48. Qual aminoácido é o aminoácido de iniciação para todas as proteínas?
    A. Cisteína
    B. Treonina
    C. Triptofano
    D. Metionina
    E. Ácido glutâmico

49. O tRNA iniciador está localizado no interior do complexo 80S ativo em qual dos três "sítios" ribossomais canônicos durante a síntese proteica?
    A. Sítio E
    B. Sítio I
    C. Sítio P
    D. Sítio A
    E. Sítio de ligação do fator de liberação

50. Nomeie a enzima que forma a ligação peptídica durante a síntese proteica e defina sua composição química.
    A. Pepsintase, proteína
    B. Peptidil transferase, RNA
    C. Peptidase, glicolipídeo
    D. peptidil transferase, proteína
    E. GTPase, glicopeptídeo

51. Mutações no meio de uma fase de leitura aberta que criam um códon de parada são chamadas de
    A. mutações de fase de leitura
    B. mutações de troca
    C. mutações não sem sentido
    D. mutações pontuais
    E. mutações sem sentido

52. Qual é a direcionalidade da síntese de polipeptídeos?
    A. Direção C-terminal para N-terminal
    B. Direção N-terminal para 3′
    C. Direção N-terminal para C-terminal
    D. Direção 3′–5′
    E. Direção 5′–3′

53. Qual dos elementos com atuação *cis* a seguir geralmente encontra-se adjacente ou se sobrepõe a muitos promotores de procariontes?
    A. Gene regulador
    B. Gene(s) estrutural (ais)
    C. Repressor
    D. Operador
    E. Terminador

54. Qual o termo empregado para um segmento de um cromossomo bacteriano em que genes para as enzimas de uma via metabólica particular estão agrupados e sujeitos a um controle coordenado?
    A. Óperon
    B. Operador
    C. Promotor
    D. Controlador do terminal
    E. Origem

55. Qual o termo empregado para a coleção completa de proteínas presente em um tipo celular particular?
    A. Genoma
    B. Coleção peptídica
    C. Transcriptoma
    D. Tradussoma
    E. Proteoma

56. Como a formação do nucleossomo no DNA genômico afeta as fases de iniciação e/ou alongamento da transcrição?
    A. Os nucleossomos inibem o acesso de enzimas envolvidas em todas as fases da transcrição.
    B. Os nucleossomos recrutam histonas e enzimas de modificação do DNA e as ações destas enzimas recrutadas afetam o acesso das proteínas de transcrição ao DNA.
    C. Os nucleossomos induzem a degradação do DNA onde o DNA entra em contato com as histonas.
    D. Os nucleossomos não têm efeito significativo na transcrição.

57. Quais os tipos de moléculas que interagem com os sítios do gene do promotor central do mRNA de eucariotos para facilitar a associação da RNA-polimerase II?
    A. Fatores de terminação
    B. Fatores de transcrição de sequência-específica (transativadores)
    C. Fatores de alongamento
    D. GTPases
    E. Fatores de transcrição basal ou geral (i.e., os GTFs)

58. A maioria dos fatores de transcrição de eucariotos contém pelo menos dois domínios, cada um dos quais medeia diferentes aspectos da função do fator de transcrição; esses domínios são
    A. domínio de ligação ao RNA e domínio de repressão.
    B. domínio de ativação e domínio de repressão.
    C. domínio de ligação ao DNA e domínio de ativação.
    D. domínio de ligação ao DNA e domínio de ligação ao ligante.
    E. domínio de ligação ao RNA e domínio de ativação.

59. Fatores de transcrição ligados a intensificadores estimulam o início da transcrição no promotor central *cis*-ligado pela ação de intermediários chamados de
    A. coativadores
    B. proteínas de cotranscrição
    C. correpressores
    D. receptores
    E. coordenadores

60. Quais reações entre as proteínas de transcrição expandem enormemente a diversidade de fatores reguladores que pode ser gerado a partir de um pequeno número de polipeptídeos?
    A. Recombinação
    B. Homodimerização
    C. Heterozigosidade
    D. Heterodimerização
    E. Trimerização

61. A região do gene contendo a TATA *box* e estendendo-se ao sítio de início da transcrição (TSS) é frequentemente chamada de
    A. lar da polimerase
    B. iniciadora
    C. seletora de início
    D. promotora central
    E. operadora

62. Qual dos seguintes mecanismos possíveis para o modo como os intensificadores podem estimular a transcrição a partir de grandes distâncias são atualmente considerados CORRETOS?
    A. Os intensificadores podem reversivelmente remover o DNA interveniente entre os intensificadores e promotores.
    B. A RNA-polimerase II se liga avidamente a sequências intensificadoras.
    C. Intensificadores desenrolam o DNA.
    D. Intensificadores podem procurar ao longo do DNA e se ligarem diretamente ao promotor central associado.
    E. Intensificadores e promotores centrais são colocados em estreita proximidade por meio da formação de uma alça de DNA mediada por proteínas de ligação ao DNA.

63. Qual dos seguintes aminoácidos de histona é geralmente acetilado?
    A. Lisina
    B. Arginina
    C. Asparagina
    D. Histidina
    E. Leucina

64. Coloque as seguintes etapas em ordem; quais são as etapas que ocorrem sequencialmente durante o evento de ativação de transcrição após a ligação de um ativador de transcrição ao sítio de ligação do ativador cognato no DNA genômico.
    1. O complexo de remodelação de cromatina se liga às histonas centrais na região alvo.
    2. As ações combinadas de vários complexos moleculares aumentam a acessibilidade do promotor à maquinaria de transcrição.
    3. O ativador recruta um coativador para uma região de cromatina que é o alvo da transcrição.
    4. A maquinaria de transcrição se reúne no sítio onde a transcrição se iniciará.
    5. O coativador acetila as histonas centrais dos nucleossomos próximos.

    A. 1 – 2 – 3 – 4 – 5
    B. 3 – 1 – 5 – 2 – 4
    C. 3 – 5 – 1 – 2 – 4
    D. 5 – 3 – 1 – 2 – 4
    E. 3 – 5 – 1 – 4 – 2

65. Qual estratégia na pesquisa de fatores de transcrição permite a identificação simultânea de todos os sítios genômicos ligados por um determinado fator de transcrição sob um certo conjunto de condições fisiológicas, monitorando e, portanto, permitindo percepções a respeito de como as redes de transcrição gênica são reguladas coordenadamente?
    A. Mapeamento de deleção sistemático.
    B. Sensibilidade da DNAase I.
    C. Imunoprecipitação de cromatina (ChIP).
    D. FISH.
    E. Microscopia de imagem por tempo de vida de fluorescência (FLIM).

66. Quais sequências se estendem entre o capuz de 5′-metilguanosina presente em mRNA de eucariotos para o códon AUG de iniciação?
    A. Códon de parada
    B. Último éxon
    C. Último íntron
    D. 3′ UTR
    E. 5′ UTR

67. Qual das seguintes características do mRNA de eucariotos contribui de maneira importante para sinalizar a meia-vida?
    A. Sequências UTR 5′
    B. O promotor
    C. O operador
    D. 3′ UTR e cauda poli(A)
    E. O primeiro íntron

SEÇÃO

V

Bioquímica da Comunicação Extracelular e Intracelular

CAPÍTULO

40

Membranas: Estrutura e Função

Robert K. Murray, M.D., Ph.D. e Daryl K. Granner, M.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Saber que as membranas biológicas são principalmente constituídas de uma bicamada lipídica e de proteínas e glicoproteínas associadas. Os principais lipídeos são os fosfolipídeos, o colesterol e os glicoesfingolipídeos.
- Reconhecer que as membranas são estruturas dinâmicas e assimétricas, que contêm uma mistura de proteínas integrais e periféricas.
- Conhecer o modelo de mosaico fluido da estrutura da membrana e saber que ele é amplamente aceito, com estruturas especializadas, que consistem em balsas lipídicas, cavéolas e junções de oclusão.
- Compreender os conceitos de difusão passiva, difusão facilitada, transporte ativo, endocitose e exocitose.
- Reconhecer que os transportadores, os canais iônicos, a Na^+-K^+-ATPase, os receptores e as junções comunicantes são participantes importantes da função da membrana.
- Saber que diversos distúrbios resultam de anormalidades na estrutura e na função das membranas, incluindo hipercolesterolemia familiar, fibrose cística, esferocitose hereditária e muitos outros distúrbios.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

As membranas são estruturas dinâmicas e altamente fluidas, que consistem em uma dupla camada lipídica e proteínas associadas. As **membranas plasmáticas** formam compartimentos fechados em torno do citoplasma para delimitar as células. A membrana plasmática apresenta **permeabilidades seletivas** e atua como barreira, mantendo, assim, as diferenças de composição entre os meios interno e externo da célula. As permeabilidades seletivas para substratos e íons são asseguradas principalmente por proteínas específicas, denominadas **transportadores** e **canais iônicos**. A membrana plasmática também realiza a troca de materiais com o meio extracelular por **exocitose** e **endocitose**, e existem áreas especiais na estrutura da membrana – **junções comunicantes** – através das quais as células adjacentes trocam materiais. Além disso, a membrana plasmática desempenha funções essenciais nas **interações intercelulares** e na **sinalização transmembrana**.

As membranas também formam **compartimentos especializados** no interior da célula. Essas membranas intracelulares ajudam a **dar forma** a muitas das estruturas morfologicamente distinguíveis (organelas), como, por exemplo, as mitocôndrias, o RE, o aparelho de Golgi, os grânulos secretores, os lisossomos e o núcleo. As membranas estabelecem a localização das **enzimas**, atuam como elementos integrantes no **acoplamento estímulo-resposta** e constituem locais de **transdução de energia**, como na fotossíntese e na fosforilação oxidativa.

A ocorrência de **mudanças** nos componentes da membrana pode afetar o balanço hídrico e o fluxo de íons e, portanto, numerosos processos intracelulares. As deficiências ou alterações específicas de determinados componentes da membrana (p. ex., causadas por mutações de genes que codificam proteínas da mem-

brana) levam a uma variedade de **doenças** (ver Tabela 40-7). Em resumo, a função celular normal depende de membranas normais.

A MANUTENÇÃO DOS MEIOS INTRACELULAR E EXTRACELULAR NORMAIS É FUNDAMENTAL PARA A VIDA

A vida originou-se em um ambiente aquoso; por esse motivo, as reações enzimáticas, os processos celulares e subcelulares foram desenvolvidos para funcionar nesse ambiente, circunscritos no interior de uma célula.

A água interna do organismo está compartimentalizada

A água constitui cerca de **60%** da massa corporal magra do corpo humano e distribui-se em dois grandes compartimentos.

Líquido intracelular (LIC)

Este compartimento representa **dois terços** da água corporal total e assegura um ambiente especializado para a célula (1) produzir, armazenar e utilizar a energia; (2) proceder a seu próprio reparo; (3) replicar-se; e (4) desempenhar funções celulares específicas.

Líquido extracelular (LEC)

Este compartimento contém cerca de **um terço** da água corporal total e está distribuído entre o plasma e os compartimentos intersticiais. O líquido extracelular é um **sistema de distribuição**. Ele traz às células nutrientes (p. ex., glicose, ácidos graxos e aminoácidos), oxigênio, vários íons e oligoelementos, bem como uma variedade de moléculas reguladoras (hormônios), que coordenam as funções de células amplamente distantes umas das outras. O líquido extracelular **remove** o CO_2, bem como produtos de degradação metabólica e compostos tóxicos ou atóxicos provenientes do ambiente celular imediato.

As composições iônicas dos líquidos intracelular e extracelular diferem acentuadamente

Conforme observado na **Tabela 40-1**, o **ambiente interno** é rico em K^+ e Mg^{2+}, sendo o fosfato o principal ânion inorgânico. O citosol das células contém elevada concentração de proteína, que atua como importante tampão intracelular. O **líquido extracelular** caracteriza-se por uma elevada concentração de Na^+ e Ca^{2+}, sendo o Cl^- o principal ânion. Por que existem essas diferenças? Acredita-se que o oceano primordial no qual a vida se originou era rico em K^+ e Mg^{2+}. Portanto, deduz-se que as reações enzimáticas e outros processos biológicos evoluíram para funcionar melhor nesse ambiente – explicando, assim, a alta concentração desses íons dentro das células. Profundas alterações teriam sido necessárias para a evolução de um conjunto totalmente novo de processos bioquímicos e fisiológicos; em vez disso, como de fato ocorreu, as **células desenvolveram barreiras** – membranas com "bombas" associadas, como a Na^+-K^+-ATPase (ver adiante) – para manter o microambiente interno.

TABELA 40-1 Comparação das concentrações médias de várias moléculas fora e dentro de uma célula de mamífero

Substância	Líquido extracelular	Líquido intracelular
Na^+	140 mmol/L	10 mmol/L
K^+	4 mmol/L	140 mmol/L
Ca^{2+} (livre)	2,5 mmol/L	0,1 μmol/L
Mg^{2+}	1,5 mmol/L	30 mmol/L
Cl^-	100 mmol/L	4 mmol/L
HCO_3^-	27 mmol/L	10 mmol/L
PO_4^{3-}	2 mmol/L	60 mmol/L
Glicose	5,5 mmol/L	0 a 1 mmol/L
Proteínas	2 g/dL	16 g/dL

AS MEMBRANAS SÃO ESTRUTURAS COMPLEXAS FORMADAS POR LIPÍDEOS, PROTEÍNAS E MOLÉCULAS CONTENDO CARBOIDRATOS

Serão analisadas principalmente as membranas encontradas nas células eucarióticas, embora muitos dos princípios descritos também se apliquem às membranas dos procariotos. As diversas membranas celulares apresentam **composições diferentes**, que se refletem na **razão entre proteínas e lipídeos** (**Figura 40-1**). Isso não é surpreendente, tendo em vista as suas funções divergentes. As membranas são estruturas fechadas semelhantes a lâminas, que consistem em uma dupla camada lipídica assimétrica, com superfícies interna e externa distintas. Essas estruturas laminares consistem em **montagens não covalentes**, que se formam espontaneamente na água, em virtude da natureza anfipática dos lipídeos. Muitas proteínas diferentes estão localizadas nas membranas, onde desempenham funções específicas.

Os principais lipídeos nas membranas dos mamíferos são os fosfolipídeos, os glicoesfingolipídeos e o colesterol

Fosfolipídeos

Das duas classes principais de fosfolipídeos existentes nas membranas, os **fosfoglicerídeos** são os mais comuns e consistem em uma estrutura de glicerol à qual estão ligados dois ácidos graxos por ligações ésteres e um álcool fosforilado (**Figura 40-2**). **Geralmente,** os **ácidos graxos** constituintes são moléculas com números pares de carbonos, contendo, mais comumente, 16 ou 18 átomos de carbono. Esses ácidos graxos não são ramificados e podem ser saturados ou não com uma ou mais ligações duplas *cis*. O fosfoglicerídeo **mais simples** é o **ácido fosfatídico**, o 1,2-diacilglicerol-3-fosfato, um intermediário essencial na formação de outros fosfoglicerídeos (Capítulo 24). Na maioria dos fosfoglicerídeos existentes nas membranas, o 3-fosfato é esterificado em um **álcool**, como colina, etanolamina, glicerol, inositol

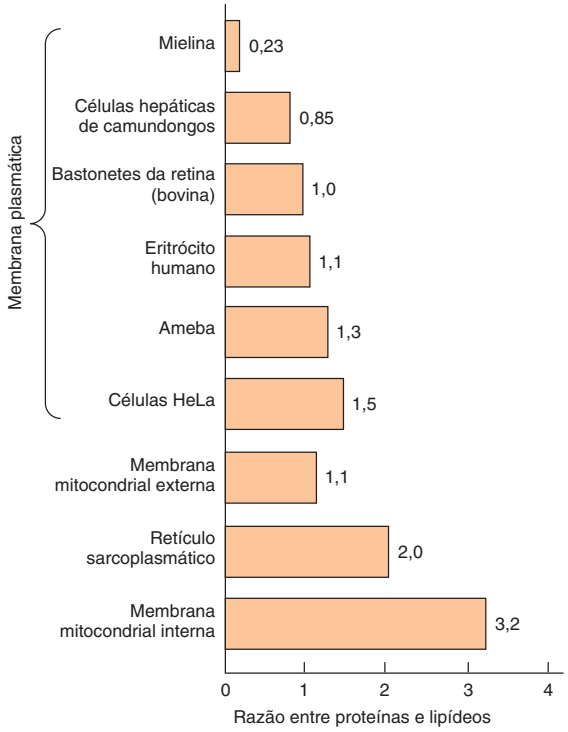


FIGURA 40-1 Razão entre proteínas e lipídeos em diferentes membranas. As proteínas estão presentes em quantidades iguais ou superiores aos lipídeos em quase todas as membranas. A exceção notável é a mielina, que atua como isolante elétrico encontrado em muitas fibras nervosas.

ou serina (Capítulo 15). Em geral, a fosfatidilcolina constitui o principal fosfoglicerídeo por massa nas membranas das células humanas.

A segunda classe principal de fosfolipídeos é constituída pela **esfingomielina** (Figura 15-13), que contém uma estrutura de esfingosina, em lugar de glicerol. Um ácido graxo está ligado ao grupo amino da esfingosina por uma ligação amida, formando a **ceramida**. Quando o grupo hidroxila primário da esfingosina é esterificado em fosforilcolina, forma-se a esfingomielina. Como o próprio nome sugere, a esfingomielina é abundante nas bainhas de mielina.

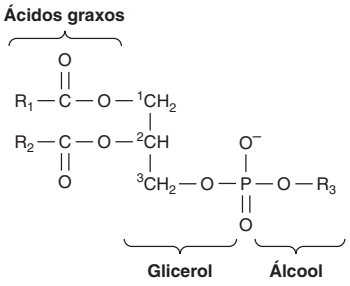


FIGURA 40-2 Um fosfoglicerídeo exibindo os ácidos graxos (R_1 e R_2), o glicerol e um componente de álcool fosforilado. Os ácidos graxos saturados estão habitualmente ligados ao carbono 1 do glicerol, e os ácidos graxos insaturados, ao carbono 2. No ácido fosfatídico, R_3 é o hidrogênio.

Glicoesfingolipídeos

Os glicoesfingolipídeos (GSL) são lipídeos que contêm açúcares formados em uma estrutura de **ceramida**; incluem a galactosilceramida e a glicosilceramida (cerebrosídeos), bem como os **gangliosídeos**. Suas estruturas são descritas no Capítulo 15. Localizam-se principalmente nas membranas plasmáticas das células, expondo seus açúcares componentes no exterior da célula.

Esteróis

O esterol mais comum nas membranas das células animais é o **colesterol** (Capítulo 15), que se localiza principalmente nas **membranas plasmáticas**, mas que também pode ser encontrado, em quantidades menores, nas mitocôndrias, nos aparelhos de Golgi e nas membranas nucleares. O colesterol fica intercalado entre os fosfolipídeos da membrana, com seu grupo hidroxila na interface aquosa, e o restante da molécula dentro do folheto. O efeito do colesterol sobre a fluidez das membranas será discutido subsequentemente. Do ponto de vista nutricional, é importante saber que o colesterol não ocorre nos vegetais.

Os lipídeos podem ser separados uns dos outros e quantificados por técnicas como a cromatografia de coluna, em camada delgada e líquido-gasosa, enquanto suas estruturas podem ser estabelecidas por espectrometria de massa e outras técnicas.

Os lipídeos da membrana são anfipáticos

Todos os lipídeos principais das membranas contêm regiões tanto hidrofóbicas quanto hidrofílicas e, por conseguinte, são conhecidos como **anfipáticos**. Se a região hidrofóbica fosse separada do restante da molécula, ela seria insolúvel em água, porém solúvel em óleo. Por outro lado, se a região hidrofílica estivesse separada do restante da molécula, ela seria insolúvel em óleo, porém solúvel em água. A natureza anfipática de um fosfolipídeo está representada na **Figura 40-3**, bem como na Figura 15-24. Assim, os **grupos cabeça polares** dos fosfolipídeos e o grupo hidroxila do colesterol ficam na interface com o ambiente aquoso; situação semelhante é observada com as **frações de açúcar** dos GSL (ver adiante).

Os **ácidos graxos saturados** possuem caudas retas, enquanto os ácidos graxos insaturados, que geralmente ocorrem na forma *cis* nas membranas, possuem caudas torcidas (Figura 40-3). À medida que mais dobras são inseridas nas caudas, os lipídeos ficam menos firmemente acondicionados, e a membrana torna-se mais fluida. O problema causado pela presença de **ácidos graxos *trans*** nos lipídeos das membranas é descrito no Capítulo 15.

Os **detergentes** são moléculas anfipáticas, que são importantes em bioquímica, bem como no ambiente doméstico. A estrutura molecular de um detergente não se assemelha àquela de um fosfolipídeo. Alguns detergentes são amplamente utilizados para **solubilizar** as proteínas da membrana, bem como na sua **purificação**. A extremidade hidrofóbica do detergente liga-se às regiões hidrofóbicas das proteínas, deslocando a maior parte dos lipídeos ligados. A extremidade polar do detergente é livre, causando a formação de complexos de detergente-proteína pelas proteínas em solução, habitualmente contendo também alguns lipídeos residuais.

Os lipídeos da membrana formam bicamadas

A natureza anfipática dos fosfolipídeos sugere que as duas regiões da molécula apresentam solubilidades incompatíveis; todavia, em

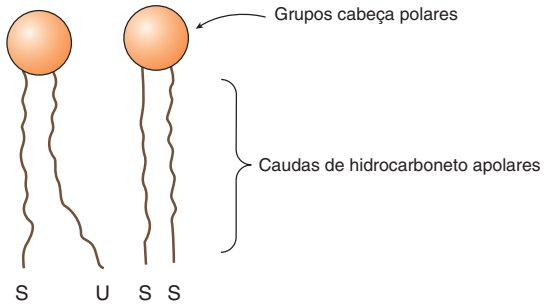


FIGURA 40-3 Representação esquemática de um fosfolipídeo ou outro lipídeo de membrana. O grupo cabeça polar é hidrofílico, enquanto as caudas de hidrocarbonetos são hidrofóbicas ou lipofílicas. Os ácidos graxos nas caudas são saturados (S) ou insaturados (I); os primeiros estão habitualmente ligados ao carbono 1 do glicerol, enquanto os últimos estão ligados ao carbono 2 (ver Figura 40-2). Observe a torção da cauda do ácido graxo insaturado (I), que é importante para conferir à membrana um aumento de fluidez.

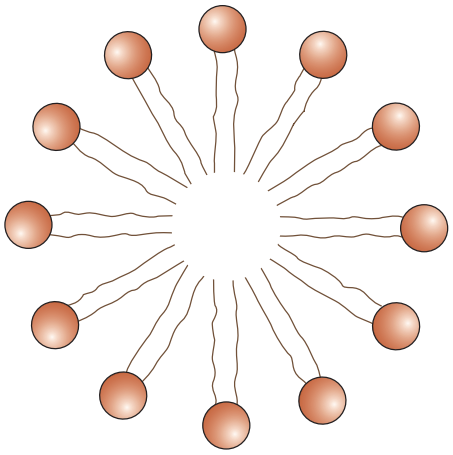


FIGURA 40-4 Seção transversal esquemático de uma micela. Os grupos cabeça polares estão banhados em água, enquanto as caudas hidrofóbicas de hidrocarboneto são circundadas por outros hidrocarbonetos e, portanto, ficam protegidas da água. As micelas são estruturas esféricas relativamente pequenas (em comparação com as bicamadas lipídicas).

um solvente como a água, os fosfolipídeos organizam-se de modo a atender termodinamicamente aos requisitos de solubilidade de ambas as regiões. A **micela** (**Figura 40-4** e Figura 15-24) é uma estrutura desse tipo; as regiões hidrofóbicas ficam protegidas da água, enquanto os grupos polares hidrofílicos estão imersos no ambiente aquoso. Entretanto, as micelas têm, em geral, dimensões **relativamente pequenas** (p. ex., ~200 nm) e, portanto, são limitadas no seu potencial de formação de membranas. Os detergentes frequentemente formam micelas.

Como foi demonstrado por Gorter e Grendel, em 1925, uma **camada bimolecular**, ou **bicamada lipídica**, também pode atender aos requisitos termodinâmicos das moléculas anfipáticas em um ambiente aquoso. As bicamadas constituem as **estruturas fundamentais** das membranas biológicas. A bicamada ocorre na forma de uma lâmina, na qual as regiões hidrofóbicas dos fosfolipídeos ficam isoladas do ambiente aquoso, enquanto as regiões hidrofílicas são expostas à água (**Figura 40-5** e Figura 15-24). As extremidades ou bordas da lâmina em dupla camada podem ser eliminadas pelo dobramento da lâmina sobre si mesma, formando uma vesícula fechada sem bordas. A bicamada fechada responde por uma das propriedades mais essenciais das membranas. É **impermeável à maioria das moléculas hidrossolúveis**, visto que seriam insolúveis no núcleo hidrofóbico da bicamada.

As bicamadas lipídicas são formadas por **automontagem**, impulsionada pelo **efeito hidrofóbico** (Capítulo 2). Quando as moléculas lipídicas se reúnem em uma dupla camada, a entropia das moléculas de solvente circundantes aumenta, devido à liberação da água imobilizada.

A partir das considerações anteriores, surgem duas questões. A primeira é quantos materiais biológicos são **lipossolúveis** e, portanto, conseguem entrar facilmente na célula? Os gases, como o oxigênio, o CO_2 e o nitrogênio – moléculas pequenas com pouca interação com solventes –, difundem-se facilmente através das regiões hidrofóbicas da membrana. Os **coeficientes de permeabilidade** de vários íons e de algumas outras moléculas de uma bicamada lipídica são apresentados na **Figura 40-6**. Os três eletrólitos mostrados (Na^+, K^+ e Cl^-) atravessam a bicamada muito mais lentamente do que água. Em geral, os coeficientes de permeabilidade das moléculas pequenas em uma dupla camada lipídica **correlacionam-se com suas solubilidades em solventes apolares**. Por exemplo, os **esteroides** atravessam mais facilmente a bicamada lipídica do que os eletrólitos. O alto coeficiente de permeabilidade da própria **água** é surpreendente, porém é explicado, em parte, pelo seu pequeno tamanho e por sua relativa ausência de carga. Muitos **fármacos** são hidrofóbicos e podem atravessar facilmente as membranas e penetrar nas células.

A segunda questão refere-se a **moléculas que não são lipossolúveis**: como são mantidos os gradientes de concentração transmembrana para moléculas não lipossolúveis? A resposta é que as **membranas contêm proteínas**, muitas das quais atravessam toda a extensão da bicamada lipídica. Essas proteínas formam **canais** para o movimento de íons e pequenas moléculas ou funcionam como **transportadores** de moléculas que, de outro modo, não conseguiriam atravessar a bicamada lipídica. Essas estruturas são descritas adiante.

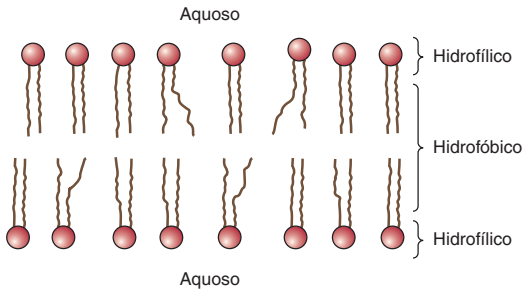


FIGURA 40-5 Diagrama de uma seção de uma membrana de dupla camada formada por moléculas de fosfolipídeos. As caudas de ácidos graxos insaturados são torcidas e proporcionam maior espaço entre os grupos cabeça polares, possibilitando, assim, maior amplitude de movimento. Isso, por sua vez, resulta em aumento da fluidez da membrana. (Ligeiramente modificada e reproduzida, com autorização, de Stryer L: *Biochemistry,* 7th ed. Freeman, 2012. Copyright © 2012, by W H. Freeman and Company.)

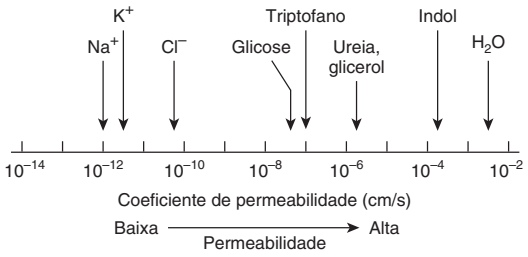


FIGURA 40-6 Coeficientes de permeabilidade da água, de alguns íons e de outras moléculas pequenas nas membranas com dupla camada lipídica. O coeficiente de permeabilidade é uma medida da capacidade de uma molécula de se difundir através de uma barreira de permeabilidade. As moléculas que atravessam rapidamente determinada membrana apresentam alto coeficiente de permeabilidade. (Ligeiramente modificada e reproduzida, com permissão, de Stryer L: *Biochemistry,* 7th ed. Freeman, 2012. Copyright © 2012.)

As proteínas da membrana estão associadas à bicamada lipídica

Os **fosfolipídeos** da membrana atuam como solvente para as proteínas de membrana, criando um ambiente no qual essas proteínas podem funcionar. Conforme descrito no Capítulo 5, a **estrutura α-helicoidal das proteínas** minimiza a natureza hidrofílica das próprias ligações peptídicas. Desse modo, as proteínas podem ser anfipáticas e formar parte integral da membrana pela presença de regiões hidrofílicas que fazem protrusão nas superfícies interna e externa da membrana, mas que estão conectadas a uma região hidrofóbica que atravessa o núcleo hidrofóbico da dupla camada. Com efeito, as partes das proteínas de membrana que atravessam as membranas contêm uma quantidade substancial de aminoácidos hidrofóbicos e quase sempre apresentam um alto conteúdo α-helicoidal. Em muitas membranas, um trecho de ~ **20 aminoácidos** em uma hélice α estende-se pela **bicamada lipídica de um lado a outro**.

É possível calcular se uma determinada sequência de aminoácidos presente em uma proteína é compatível com uma **localização transmembrana**. Isso pode ser feito consultando uma tabela que relaciona as hidrofobicidades de cada um dos 20 aminoácidos comuns e os valores de energia livre para a sua transferência do interior de uma membrana para a água. Os aminoácidos hidrofóbicos possuem valores positivos, enquanto os aminoácidos polares possuem valores negativos. Os valores de energia livre total para a transferência de sequências sucessivas de 20 aminoácidos da proteína são representados graficamente, produzindo o denominado **gráfico de hidropatia**. Os valores acima de 20 kcal mol^{-1} são compatíveis com – mas não comprovam – a interpretação de que a sequência hidrofóbica é um segmento transmembrana.

Outro aspecto da interação entre lipídeos e proteínas é o fato de que algumas proteínas estão **ancoradas** a um folheto da bicamada lipídica por **ligações covalentes com determinados lipídeos**. O **palmitato** e o **miristato** são ácidos graxos envolvidos nessas ligações com proteínas citosólicas específicas. Diversas proteínas de superfície celular (ver Capítulo 47) estão ligadas à membrana plasmática por **estruturas de glicofosfatidilinositol** (**GPI**).

Diferentes membranas apresentam composições distintas de proteínas

A **quantidade de proteínas diferentes** em uma proteína varia de menos de doze no retículo sarcoplasmático das células musculares até mais de 100 na membrana plasmática. As proteínas de membrana podem ser separadas uma das outras por meio de **eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio** (SDS-PAGE), técnica que separa as proteínas com base em sua massa molecular. Utilizando proteínas padrões de massa molecular conhecida como comparação, é possível estimar a massa molecular aproximada de uma proteína desconhecida por SDS-PAGE. O SDS é um poderoso detergente que rompe as interações proteína-lipídeo e, portanto, solubiliza as proteínas de membrana. O SDS também rompe as interações de proteína-proteína e desdobra ou desnatura as proteínas. Na ausência de SDS, poucas proteínas de membrana permaneceriam solúveis.

As proteínas constituem as **principais moléculas funcionais** das membranas e consistem em **enzimas**, **bombas** e **transportadores**, **canais**, **componentes estruturais**, **antígenos** (p. ex., de histocompatibilidade) e **receptores** para várias moléculas. Como cada tipo de membrana possui um complemento diferente de proteínas, não existe uma estrutura de membrana típica. As propriedades enzimáticas de várias membranas diferentes são apresentadas na **Tabela 40-2**.

As membranas são estruturas dinâmicas

As membranas e seus componentes são **estruturas dinâmicas**. Os **lipídeos e as proteínas** nas membranas sofrem **renovação**, assim como o fazem em outros compartimentos da célula. Os diversos lipídeos apresentam diferentes taxas de renovação, e as taxas de renovação de espécies distintas de proteínas de membrana podem variar amplamente. A própria membrana pode sofrer renovação ainda mais rapidamente do que qualquer um de seus componentes. Essa característica é discutida de modo mais detalhado na seção sobre endocitose.

TABELA 40-2 Marcadores enzimáticos de diferentes membranas[1]

Membrana	Enzima
Plasmática	5′-Nucleotidase Adenilil-ciclase Na^+–K^+-ATPase
Retículo endoplasmático	Glicose-6-fosfatase
Aparelho de Golgi	
Cis	GlcNAc transferase I
Medial	Golgi manosidase II
Trans	Galactosil transferase
TGN	Sialil transferase
Membrana mitocondrial interna	ATP-sintase

[1]As membranas contêm numerosas proteínas, algumas das quais possuem atividade enzimática. Algumas dessas enzimas estão localizadas apenas em determinadas membranas e, portanto, podem ser utilizadas como marcadores para acompanhar a purificação dessas membranas.
Abreviatura: TGN, rede *trans* Golgi.

Outro indicador da natureza dinâmica das membranas é o fato de que diversos estudos demonstraram que os lipídeos e algumas proteínas sofrem **difusão lateral** no plano de suas membranas. Algumas proteínas não exibem difusão lateral, visto que elas estão ancoradas ao citoesqueleto de actina subjacente. Por outro lado, o movimento **transversal** dos lipídeos através da membrana (**flip-flop**) é extremamente lento (ver adiante) e não é observado no caso das proteínas de membrana.

As membranas são estruturas assimétricas

As proteínas assumem orientações singulares nas membranas, de modo que as **superfícies externas são diferentes das superfícies internas**. A **assimetria entre o lado interno e o lado externo** também é assegurada pela localização externa dos carboidratos ligados às proteínas da membrana. Além disso, existem proteínas específicas que estão localizadas exclusivamente no lado externo ou interno das membranas.

As membranas também exibem **heterogeneidade regional**. Algumas, como as que ocorrem nas bordas vilosas das células da mucosa, são quase visíveis ao exame macroscópico. Outras, como aquelas das junções comunicantes, junções de oclusão e sinapses, ocupam regiões muito menores da membrana e produzem assimetrias locais correspondentemente menores.

Existe também uma **assimetria dos fosfolipídeos** entre os lados interno e externo. Os **fosfolipídeos que contêm colina** (fosfatidilcolina e esfingomielina) estão localizados principalmente na **lâmina externa**; os **aminofosfolipídeos** (fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina) localizam-se preferencialmente na **lâmina interna**. Naturalmente, para que essa assimetria exista, deve haver uma mobilidade transversal (*flip-flop*) limitada dos fosfolipídeos da membrana. Com efeito, os fosfolipídeos em bicamadas sintéticas exibem uma **taxa extraordinariamente lenta de *flip-flop***; a meia-vida da assimetria pode ser medida em várias semanas.

Os mecanismos envolvidos no **estabelecimento da assimetria dos lipídeos** não estão bem elucidados. As enzimas envolvidas na síntese dos fosfolipídeos estão localizadas no lado citoplasmático das vesículas de membrana microssomais. Existem translocases (***flip*-pases**) que transferem determinados fosfolipídeos (p. ex., fosfatidilcolina) da lâmina interna para a externa. **Proteínas específicas que se ligam** preferencialmente a determinados fosfolipídeos também parecem estar presentes nas duas lâminas, contribuindo para a distribuição assimétrica dessas moléculas lipídicas. Além disso, as **proteínas de troca de fosfolipídeos** reconhecem fosfolipídeos específicos e os transferem de uma membrana (p. ex., retículo endoplasmático [RE]) para outras (p. ex., membrana mitocondrial e peroxissomal). Uma questão relacionada é saber **como os lipídeos entram nas membranas**. Essa questão não foi estudada tão intensamente quanto o processo de como as proteínas entram nas membranas (ver Capítulo 46), e os conhecimentos ainda são relativamente escassos. Muitos lipídeos da membrana são sintetizados no RE. Pelo menos três vias foram identificadas. (1) O transporte a partir do RE em vesículas, que, em seguida, transferem os lipídeos para a membrana receptora. (2) Entrada por contato direto de uma membrana (p. ex., o RE) com outra, facilitada por proteínas específicas. (3) Transporte pelas proteínas de troca de fosfolipídeos (também conhecidas como proteínas de transferência de lipídeos) já mencionadas. Esse processo só efetua trocas de lipídeos, mas não realiza nenhuma transferência efetiva.

Existe uma **assimetria adicional** em relação aos glicoesfingolipídeos e às **glicoproteínas**, todas as **frações de açúcar** dessas moléculas **fazem protrusão para fora** da membrana plasmática e estão ausentes na superfície interna. Por conseguinte, essas células são "revestidas de açúcar".

As membranas contêm proteínas integrais e periféricas

É útil classificar as proteínas de membrana em dois tipos: **integrais** e **periféricas** (**Figura 40-7**). A maioria das proteínas de membrana pertence à classe das proteínas integrais, ou seja, elas interagem extensamente com os fosfolipídeos e **exigem o uso de detergentes** para a sua solubilização. Além disso, elas geralmente se estendem de um lado a outro da bicamada lipídica, sob a forma de um feixe de segmentos transmembrana α-helicoidais. Em geral, as proteínas integrais são **globulares** e **anfipáticas**. Essas proteínas consistem em duas extremidades hidrofílicas separadas por uma região hidrofóbica interveniente, que atravessa o núcleo hidrofóbico da dupla camada. À medida que as estruturas das proteínas integrais de membrana foram elucidadas, ficou evidente que algumas delas (p. ex., moléculas transportadoras, canais iônicos, vários receptores e proteínas G) **atravessam a bicamada várias vezes de um lado a outro** (ver Figura 46-7), enquanto outras proteínas simples de membrana (p. ex., glicoforina A) **atravessam apenas uma vez a membrana**. As proteínas integrais exibem uma **distribuição assimétrica** por meio da dupla camada da membrana. Essa orientação assimétrica é adquirida por ocasião de sua inserção na bicamada lipídica durante a biossíntese no RE. Os mecanismos moleculares envolvidos na inserção das proteínas nas membranas e a montagem das membranas são discutidos no Capítulo 46.

As **proteínas periféricas** não interagem diretamente com os núcleos hidrofóbicos dos fosfolipídeos na bicamada lipídica e, portanto, **não exigem o uso de detergentes** para a sua liberação. Essas proteínas estão ligadas às regiões hidrofílicas de proteínas integrais específicas e aos grupos cabeça de fosfolipídeos, podendo ser liberadas mediante tratamento com **soluções salinas de alta concentração iônica**. Por exemplo, a **anquirina**, uma proteína periférica, está ligada à superfície interna da "banda 3" de proteína integral da membrana do eritrócito. A **espectrina**, estrutura citoesquelética dentro do eritrócito, está ligada, por sua vez, à anquirina e, desse modo, desempenha um importante papel na manutenção do formato bicôncavo do eritrócito.

MEMBRANAS ARTIFICIAIS COMO MODELO DE FUNÇÃO DAS MEMBRANAS

É possível preparar sistemas de membranas artificiais por técnicas apropriadas. Em geral, esses sistemas consistem em misturas de um ou mais **fosfolipídeos** de origem natural ou sintética, que podem ser tratados (p. ex., por **sonicação leve**) para formar vesículas esféricas nas quais os lipídeos formam uma bicamada. Essas vesículas, circundadas por uma bicamada lipídica com interior aquoso, são denominadas **lipossomos** (ver Figura 15-24).

Algumas das vantagens e aplicações dos sistemas de membranas artificiais no estudo da função das membranas são as seguintes:

1. O **teor lipídico** das membranas pode ser variado, possibilitando o exame sistemático dos efeitos da composição variável dos lipídeos sobre determinadas funções.
2. **Proteínas ou enzimas de membrana purificadas** podem ser incorporadas a essas vesículas para determinar os fatores (p. ex., lipídeos específicos ou proteínas complementares) necessários para que as proteínas possam recuperar sua função.
3. O **ambiente** desses sistemas pode ser rigorosamente controlado e sistematicamente variado (p. ex., concentrações iônicas e ligantes).
4. Quando os lipossomos são formados, podem ser preparados para **incorporar** determinados compostos em seu interior, como, por exemplo, fármacos e genes isolados. Existe um interesse em utilizar os lipossomos para distribuir fármacos em determinados tecidos, e, se determinados componentes (p. ex., anticorpos dirigidos contra certas moléculas da superfície celular) pudessem ser incorporados aos lipossomos, de modo que fossem direcionados para tecidos ou tumores específicos, o impacto terapêutico seria considerável. O **DNA** incorporado no interior de lipossomos parece ser menos sensível ao ataque das nucleases; essa abordagem pode ser útil nos esforços aplicados na **terapia gênica**.

O MODELO DE MOSAICO FLUIDO DA ESTRUTURA DA MEMBRANA É AMPLAMENTE ACEITO

O **modelo de mosaico fluido** da estrutura da membrana, proposto em 1972 por Singer e Nicolson (**Figura 40-7**) é, hoje, amplamente aceito. Esse modelo é frequentemente comparado com um ***iceberg*** (proteínas de membrana) **flutuando em um oceano** de moléculas de fosfolipídeos predominantemente fluidas. A primeira **evidência** desse modelo foi a descoberta de que algumas **proteínas integrais** (detectadas por técnicas de marcação fluorescente) redistribuíam-se rapidamente e de modo aleatório na membrana plasmática de uma célula híbrida formada pela fusão artificialmente induzida de duas células precursoras diferentes (de camundongo e humana). Estudos de biofísica das proteínas integrais mostraram que elas se estendem de um lado a outro da membrana e são de natureza globular. Subsequentemente, foi demonstrado que os **fosfolipídeos** sofrem uma redistribuição ainda mais rápida no plano da membrana. Essa difusão no plano da membrana, denominada **difusão lateral**, pode ser muito rápida para um fosfolipídeo; com efeito, no plano da membrana, uma molécula de fosfolipídeo pode mover-se a uma distância de vários micrômetros por segundo.

As **mudanças de fase** – e, portanto, a **fluidez** das membranas –, em grande parte, **dependem da composição lipídica** da membrana. Em uma bicamada lipídica, as cadeias hidrofóbicas dos ácidos graxos podem estar altamente alinhadas ou ordenadas, de modo a formar uma estrutura bastante rígida. À medida que a temperatura aumenta, as cadeias laterais hidrofóbicas passam por uma **transição** do **estado ordenado** (fase mais semelhante ao gel ou cristalina) para um estado **desordenado,** assumindo um arranjo mais semelhante ao líquido ou fluido. A temperatura em que a estrutura sofre transição do estado ordenado para o desordenado (ou seja, derrete) é conhecida como "**temperatura de transição**" (T_m). As cadeias de ácidos graxos **mais longas** e mais **saturadas** interagem mais fortemente entre si por meio de suas cadeias de hidrocarboneto mais longas e, portanto, geram valores mais altos de T_m – isto é, são necessárias temperaturas mais elevadas para aumentar a fluidez da bicamada. Por outro

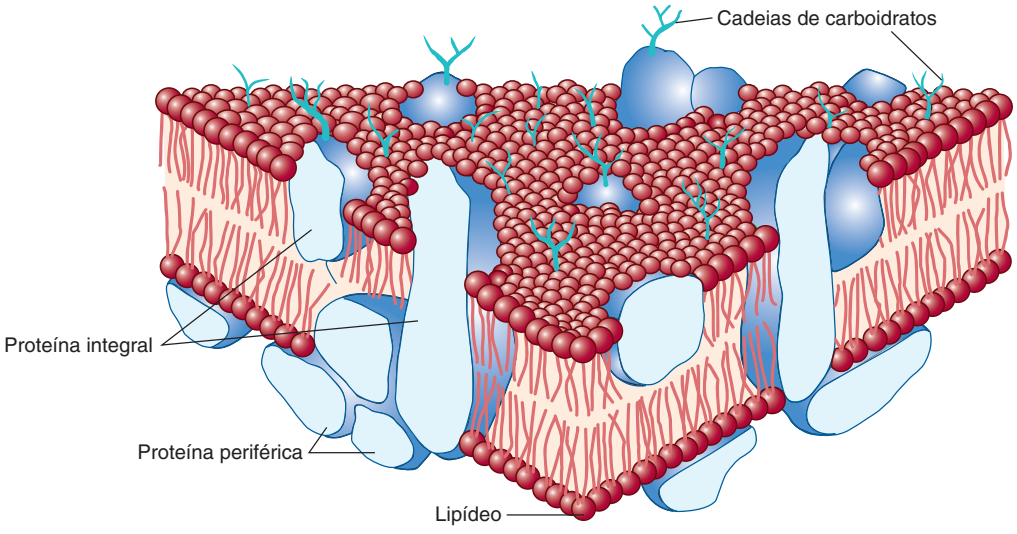


FIGURA 40-7 O modelo de mosaico fluido da estrutura da membrana. A membrana consiste em uma camada lipídica bimolecular, com proteínas inseridas ou ligadas a uma de suas superfícies. As proteínas de membrana integrais estão firmemente inseridas nas camadas lipídicas. Algumas dessas proteínas atravessam completamente a bicamada e são denominadas proteínas transmembrana, enquanto outras estão embebidas na camada externa ou interna da bicamada lipídica. As proteínas periféricas estão frouxamente ligadas à superfície externa ou interna da membrana. Muitas das proteínas e todos os glicolipídeos apresentam cadeias oligossacarídicas expostas no lado externo. (Reproduzida, com autorização, de Junqueira LC, Carneiro J: *Basic Histology: Text & Atlas,* 10th ed., McGraw Hill, 2003.)

lado, as **ligações insaturadas** que existem na configuração *cis* tendem a aumentar a fluidez da bicamada ao reduzir a densidade das cadeias laterais acondicionadas, sem diminuir a hidrofobicidade (Figura 40-3). Os fosfolipídeos das membranas celulares geralmente contêm pelo menos um ácido graxo insaturado com pelo menos uma dupla ligação *cis*.

O **colesterol** modifica a fluidez das membranas. Em temperaturas abaixo da T_m, o colesterol interfere na interação das caudas de hidrocarboneto dos ácidos graxos e, portanto, **aumenta a fluidez**. Em temperaturas acima da T_m, ele limita o desordenamento, visto que é mais rígido do que as caudas de hidrocarboneto dos ácidos graxos e não consegue se mover na membrana na mesma extensão, **limitando**, assim, a **fluidez**. Com uma elevada razão entre colesterol e fosfolipídeos, as temperaturas de transição também são indistinguíveis.

A **fluidez** da membrana afeta significativamente as suas **funções**. À medida que a fluidez da membrana aumenta, o mesmo ocorre com a sua **permeabilidade** à água e a outras moléculas hidrofílicas pequenas. A mobilidade lateral das proteínas integrais aumenta à medida que a fluidez da membrana aumenta. Se o sítio ativo de uma proteína integral envolvida em determinada função estiver exclusivamente em suas regiões hidrofílicas, a mudança da fluidez lipídica provavelmente terá pouco efeito sobre a atividade da proteína; entretanto, se a proteína estiver envolvida em uma função de transporte, na qual os componentes transportadores atravessam a membrana de um lado a outro, os efeitos da fase lipídica podem alterar significativamente a **taxa de transporte**. O **receptor de insulina** é um excelente exemplo de alteração da função com as mudanças de fluidez. Conforme aumenta a concentração de **ácidos graxos insaturados** na membrana (por cultura de células em meio rico nessas moléculas), **a fluidez aumenta**. Isso altera o receptor, de modo que ele passa a ligar uma maior quantidade de insulina. Na temperatura corporal normal (37°C), a bicamada lipídica encontra-se em um estado fluido. As bactérias podem modificar a composição dos lipídeos de sua membrana para se adaptar a mudanças de temperatura.

As balsas lipídicas, as cavéolas e as junções de oclusão são estruturas especializadas das membranas plasmáticas

As membranas plasmáticas contêm **certas estruturas especializadas**, cuja natureza bioquímica foi investigada com alguns detalhes.

As **balsas lipídicas** são áreas especializadas da lâmina exoplasmática da bicamada lipídica, enriquecidas com colesterol, esfingolipídeos e certas proteínas (ver **Figura 40-8**). Essas estruturas estão envolvidas na **transdução de sinais** e **outros processos**. Acredita-se que o estreito agrupamento de certos componentes dos sistemas de sinalização possa aumentar a eficiência de sua função.

As **cavéolas** podem originar-se das balsas lipídicas. Muitas delas, se não todas, contêm a proteína **caveolina-1**, que pode estar envolvida na sua formação a partir das balsas. As cavéolas podem ser detectadas à microscopia eletrônica como indentações em forma de frasco na membrana celular do lado do citosol (**Figura 40-9**). As proteínas detectadas nas cavéolas incluem vários componentes do sistema de transdução de sinais (p. ex., o receptor de insulina e algumas proteínas G), o receptor de folato e a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). As cavéolas e as balsas lipídicas constituem áreas de pesquisa ativa, e os conceitos relativos a seus possíveis papéis em vários distúrbios estão evoluindo rapidamente.

As **junções de oclusão** (zônula de oclusão) são outras estruturas encontradas nas superfícies das membranas. Com frequência, estão localizadas abaixo das superfícies apicais das células epiteliais e **impedem a difusão de macromoléculas entre as células**. As junções de oclusão são constituídas de **várias proteínas,** incluindo ocludina, várias claudinas e moléculas de adesão juncional.

Outras estruturas especializadas também encontradas nas membranas superficiais incluem os **desmossomos, as junções de adesão** e **as microvilosidades**; a sua natureza química e funções não são discutidas neste capítulo. A natureza das **junções comunicantes** é descrita adiante.

A SELETIVIDADE DA MEMBRANA PERMITE AJUSTES NA COMPOSIÇÃO E FUNÇÃO DAS CÉLULAS

Se a membrana plasmática é relativamente impermeável, **como a maioria das moléculas entra na célula?** De que modo a **seletividade** desse movimento é estabelecida? As respostas a essas perguntas são importantes para compreender como as células se adaptam ao ambiente extracelular em constante mudança. Os organismos metazoários também precisam ter **meios de comunicação** entre células adjacentes e distantes, de modo que os processos biológicos complexos possam ser coordenados. Esses

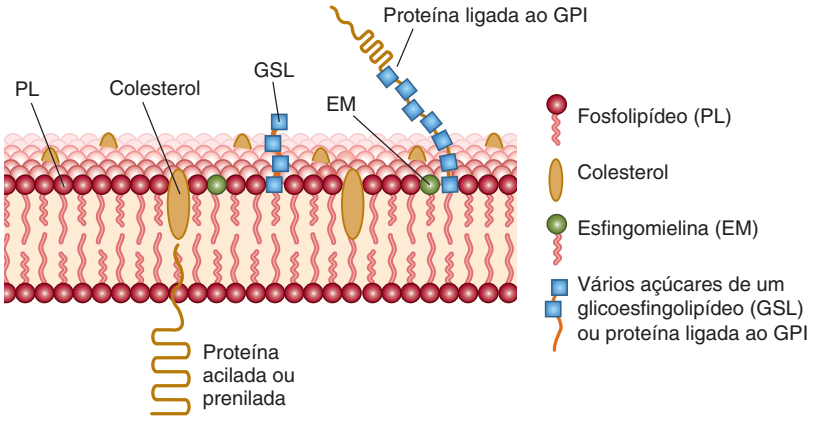


FIGURA 40-8 Ilustração esquemática de uma balsa lipídica. As balsas lipídicas são um pouco mais espessas do que o restante da bicamada lipídica. São ricas em esfingolipídeos (p. ex., esfingomielina), glicoesfingolipídeos (p.e x., o gangliosídeo GM_1), fosfolipídeos saturados e colesterol. Além disso, contêm certas proteínas ligadas ao GPI (lâmina externa), bem como proteínas aciladas e preniladas (lâmina interna). As proteínas ligadas ao GPI são discutidas no Capítulo 47. A acilação e a prenilação são modificações pós-tradução de determinadas proteínas da membrana.

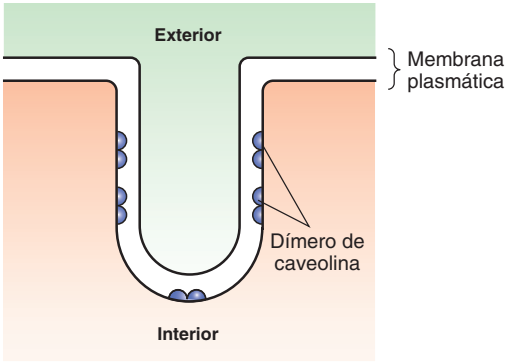


FIGURA 40-9 Ilustração esquemática de uma cavéola. A cavéola é uma invaginação da membrana plasmática. A proteína caveolina parece desempenhar um importante papel na formação das cavéolas e ocorre na forma de dímero. Cada monômero de caveolina está ancorado na camada interna da membrana plasmática por três moléculas de palmitoil (não ilustradas).

TABELA 40-3 Transferência de materiais e informações através das membranas

Movimento transversal de pequenas moléculas na membrana
Difusão (passiva e facilitada)
Transporte ativo
Movimento transversal de grandes moléculas na membrana
Endocitose
Exocitose
Transmissão de sinais através das membranas
Receptores de superfície celular
1. Transdução de sinais (p. ex., glucagon → AMPc)
2. Internalização de sinais (acoplada com endocitose, como, por exemplo, o receptor de LDL)
Movimento para os receptores intracelulares (hormônios esteroides; uma forma de difusão)
Contato e comunicação intercelulares

A difusão passiva (simples) é o fluxo de um soluto de uma concentração mais alta para uma concentração mais baixa, devido ao movimento térmico aleatório.
A difusão facilitada é o transporte passivo de um soluto de uma concentração mais alta para uma concentração mais baixa, mediado por uma proteína transportadora específica.
O transporte ativo é o transporte de um soluto através da membrana na direção da concentração aumentada, e, portanto, requer energia (frequentemente obtida da hidrólise do ATP); é necessário um transportador específico (bomba).

Os outros termos empregados nesta tabela são explicados posteriormente neste capítulo ou em outra parte do texto.

sinais precisam chegar à membrana e ser transmitidos por ela, ou devem ser **gerados** como consequência de alguma interação com a membrana. A **Tabela 40-3** relaciona alguns dos principais mecanismos utilizados para atingir esses distintos objetivos.

A difusão passiva envolvendo transportadores e canais iônicos movimenta muitas moléculas pequenas através das membranas

As moléculas podem atravessar **passivamente** a bicamada ao longo de gradientes eletroquímicos por **difusão simples** ou por **difusão facilitada**. Esse movimento espontâneo em direção ao equilíbrio diferencia-se do **transporte ativo**, que **requer energia**, visto que representa um movimento contra um gradiente eletroquímico. A **Figura 40-10** fornece uma representação esquemática desses mecanismos. Em primeiro lugar, serão descritos os vários aspectos do transporte passivo e, em seguida, os aspectos do transporte ativo.

Primeiramente, é necessário definir vários termos. A **difusão simples** refere-se ao fluxo passivo de um soluto de uma concentração mais alta para uma concentração mais baixa, devido ao movimento térmico aleatório. A **difusão facilitada** é o transporte passivo de um soluto de uma concentração mais alta para uma concentração mais baixa, mediado por uma proteína transportadora específica. O **transporte ativo** é o transporte de um soluto através de uma membrana contra um gradiente de concentração que, portanto, requer energia (frequentemente obtida da hidrólise do ATP); é necessário um transportador específico (**bomba**).

Conforme mencionado neste capítulo, alguns solutos, como os gases, podem entrar na célula por difusão a favor de um gradiente eletroquímico através da membrana, não exigindo energia metabólica. A **difusão simples** de um soluto através da membrana é limitada pela **agitação térmica** dessa molécula específica, pelo **gradiente de concentração** através da membrana e pela **solubilidade** desse soluto (coeficiente de permeabilidade, Figura 40-6) no núcleo hidrofóbico da bicamada lipídica da membrana. A **solubilidade** é inversamente proporcional ao número de pontes de hidrogênio que precisam ser rompidas para que um soluto na fase aquosa externa seja incorporado na bicamada hidrofóbica. Os eletrólitos, que são pouco solúveis em lipídeos, não formam pontes de hidrogênio com a água, mas **adquirem uma camada de água** a partir de hidratação por interação eletrostática. O tamanho da camada é diretamente proporcional à **densidade de carga** do eletrólito. Os eletrólitos com alta densidade de carga apresentam uma camada de hidratação maior e, portanto, uma taxa de difusão mais lenta. Por exemplo, o Na^+ apresenta uma densidade de carga maior que a do K^+. Assim, o **Na^+ hidratado** é **maior** do que o **K^+ hidratado**, razão pela qual este último tende a se mover mais facilmente através da membrana.

Os fatores descritos a seguir afetam a **difusão efetiva** de uma substância. (1) Seu **gradiente de concentração** através da membrana: os solutos são transferidos de uma concentração mais alta para uma concentração mais baixa. (2) O **potencial elétrico** através da membrana: os solutos movem-se na direção da solução que tem carga contrária. Em geral, o interior da célula possui carga negativa. (3) O **coeficiente de permeabilidade** da substância na membrana. (4) O **gradiente de pressão** hidrostática através da membrana: o aumento da pressão irá aumentar a taxa e a força das colisões entre as moléculas e a membrana. (5) **Temperatura**: a elevação da temperatura irá aumentar o movimento das partículas e, portanto, elevar a frequência das colisões entre as partículas externas e a membrana.

A **difusão facilitada** envolve certos **transportadores** ou **canais iônicos** (ver **Figura 40-11**). **Outros transportadores** (principalmente impulsionados pelo ATP) estão envolvidos no **transporte ativo**. Existem numerosos **transportadores e canais** nas membranas biológicas que fornecem a via de entrada

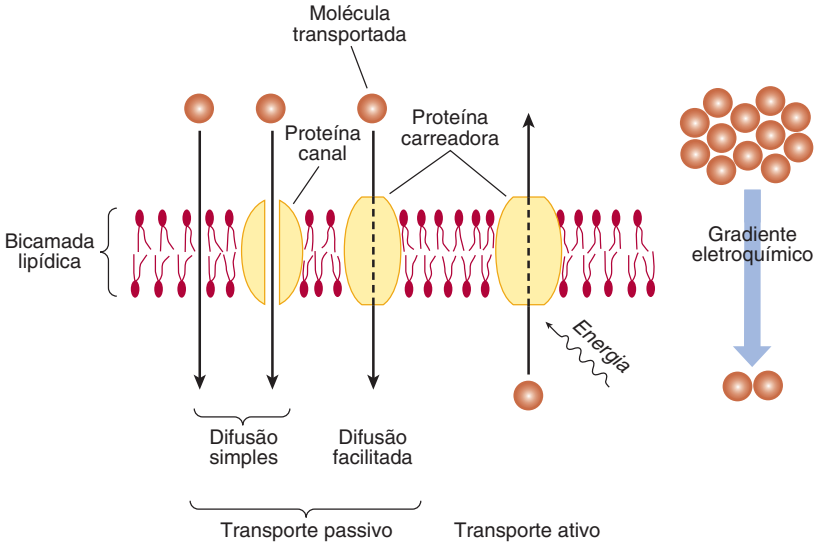


FIGURA 40-10 Muitas moléculas pequenas sem carga atravessam livremente a bicamada lipídica por difusão simples. As moléculas maiores sem carga e algumas moléculas pequenas sem carga são transferidas por proteínas carreadoras específicas (transportadores) ou por canais ou poros. O transporte passivo ocorre sempre ao longo de um gradiente eletroquímico, no sentido do equilíbrio. O transporte ativo ocorre contra um gradiente eletroquímico e requer o consumo de energia, o que não ocorre com o transporte passivo. (Redesenhada e reproduzida, com autorização, de Alberts B et al.: *Molecular Biology of the Cell.* Garland, 1983.)

de íons para dentro e para fora das células. Essas estruturas são descritas nas seções adiante. A **Tabela 40-4** fornece um resumo de alguns pontos importantes de diferença entre transportadores e canais iônicos.

Os transportadores são proteínas específicas envolvidas na difusão facilitada e também no transporte ativo

Os sistemas de transporte podem ser descritos do ponto de vista funcional, de acordo com o número de moléculas transportadas e a direção do movimento (**Figura 40-12**), ou de acordo com a direção do movimento, aproximando-se ou afastando-se do equilíbrio. A **classificação** seguinte depende principalmente do primeiro. O sistema **uniporte** possibilita o movimento bidirecional de um tipo de molécula. Nos sistemas **cotransportadores**, a transferência de um soluto depende da transferência simultânea ou sequencial estequiométrica de outro soluto. O sistema **simporte** transfere dois solutos na mesma direção. São exemplos o transportador de próton-açúcar nas bactérias e os transportadores de Na^+-açúcar (para a glicose e alguns outros açúcares) e de Na^+-aminoácidos nas células dos mamíferos. Os sistemas **antiporte** transferem duas moléculas em direções contrárias (p. ex., Na^+ para dentro e Ca^{2+} para fora).

As moléculas hidrofílicas que não podem atravessar livremente a bicamada lipídica da membrana o fazem passivamente por **difusão facilitada** ou por **transporte ativo**. O transporte passivo é impulsionado pelo gradiente transmembrana de substrato. O transporte ativo sempre ocorre contra um gradiente elétrico ou químico, de modo que necessita de energia, habitualmente do ATP. Ambos os tipos de transporte envolvem **proteínas carreadoras específicas** (transportadores) e ambos exibem **especificidade** para íons, açúcares e aminoácidos. Os transportes passivo e ativo **assemelham-se a uma interação entre substrato e enzima**. Os aspectos semelhantes entre ambos e a ação enzimática são os seguintes: (1) Existe um sítio de ligação específico para o soluto. (2) O carreador é saturável, de modo que ele apresenta uma taxa máxima de transporte ($V_{máx}$; **Figura 40-13**). (3) Existe uma constante de ligação (K_m) para o soluto, de modo que todo o sistema tem uma K_m (Figura 40-13). (4) Inibidores competitivos estruturalmente semelhantes bloqueiam o transporte. Por conseguinte, os transportadores são semelhantes a enzimas, porém geralmente não modificam seus substratos.

Os **cotransportadores** utilizam o gradiente de um substrato criado pelo transporte ativo para impulsionar o movimento do outro substrato. O gradiente de Na^+ produzido pela Na^+-K^+-ATPase é usado para impulsionar o transporte de vários metabólitos importantes. A ATPase é um exemplo muito importante de **transporte primário**, enquanto os sistemas dependentes de Na^+ são exemplos de **transporte secundário** que dependem do gradiente produzido por outro sistema. Desse modo, a inibição da Na^+-K^+-ATPase nas células também bloqueia a captação dependente de Na^+ de substâncias como a glicose.

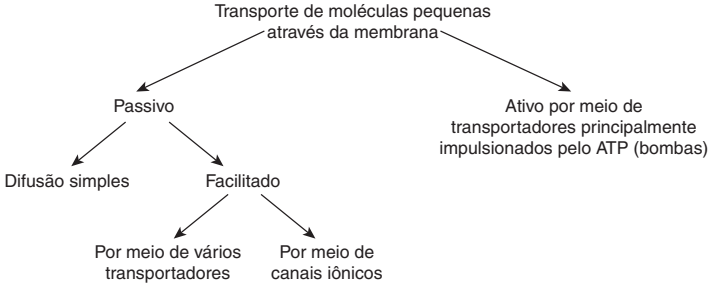


FIGURA 40-11 Ilustração esquemática dos dois tipos de transporte de moléculas pequenas através da membrana.

TABELA 40-4 Comparação dos transportadores e canais iônicos

Transportadores	Canais iônicos
Ligam-se ao soluto e sofrem alterações de sua conformação, transferindo o soluto através da membrana	Formam poros nas membranas
Envolvidos no transporte passivo (difusão facilitada) e ativo	Envolvidos apenas no transporte passivo
O transporte é significativamente mais lento do que aquele por meio dos canais iônicos	O transporte é significativamente mais rápido do que aquele por meio de transportadores

Nota: Os transportadores são também conhecidos como carreadores ou permeases. Os transportadores ativos são frequentemente denominados bombas.

A difusão facilitada é mediada por uma variedade de transportadores específicos

Alguns solutos específicos difundem-se a favor de gradientes eletroquímicos, através da membrana, **mais rapidamente** do que seria esperado com base no seu tamanho, sua carga ou no seu coeficiente de partição. Isso se deve à participação de transportadores específicos. Essa **difusão facilitada** exibe propriedades distintas daquelas observadas na difusão simples. A taxa de difusão facilitada, que é um sistema uniporte, pode ser **saturada**, isto é, o número de sítios envolvidos na difusão dos solutos específicos parece ser limitado. Muitos sistemas de difusão facilitada são **estereoespecíficos**, porém, à semelhança da difusão simples, são **impulsionados pelo gradiente eletroquímico transmembrana.**

O **mecanismo de** "**pingue-pongue**" (**Figura 40-14**) ajuda a explicar a difusão facilitada. Nesse modelo, a proteína carreadora existe em duas conformações principais. No estado "**pingue**", ela fica exposta a altas concentrações do soluto, e as moléculas do soluto ligam-se a sítios específicos na proteína transportadora. A ligação induz uma **alteração da conformação**, que expõe o carreador a uma concentração mais baixa de soluto (estado "**pongue**"). Esse processo é totalmente **reversível**, e o fluxo final através da membrana depende do gradiente de concentração. A **taxa** de entrada do soluto em uma célula por difusão facilitada é determinada pelos seguintes fatores: (1) o gradiente de concentração através da membrana; (2) a quantidade de carreador disponível (trata-se de uma etapa de controle essencial); (3) a afinidade da interação entre soluto e carreador; (4) a rapidez da alteração de conformação no carreador tanto carregado quanto descarregado.

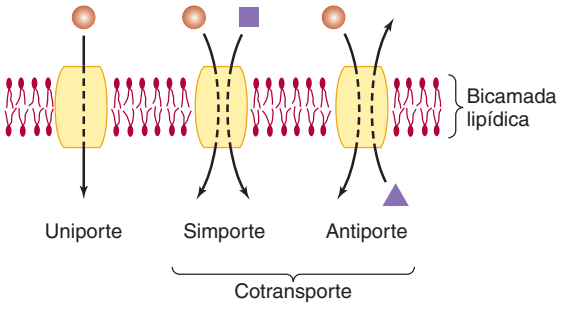


FIGURA 40-12 Representação esquemática dos tipos de sistema de transporte. Os transportadores podem ser classificados com base na direção do movimento e na transferência de um ou mais moléculas específicas. O uniporte também pode possibilitar um movimento em direção contrária, dependendo da concentração da molécula transportada dentro e fora da célula. (Redesenhada e reproduzida, com autorização, de Alberts B et al.: *Molecular Biology of the Cell.* Garland, 1983.)

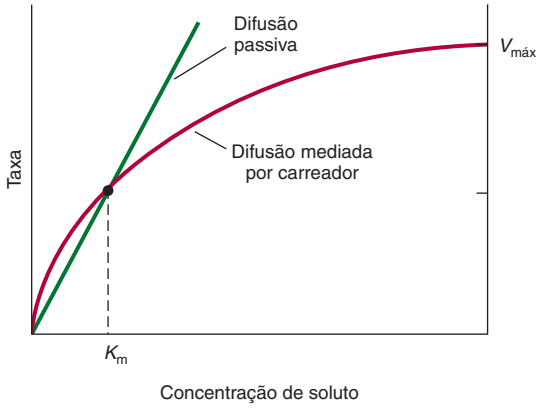


FIGURA 40-13 Comparação da cinética de difusão mediada por carreador (facilitada) com a difusão passiva. A taxa de movimento na difusão passiva é diretamente proporcional à concentração de soluto, enquanto o processo é saturável quando estão envolvidos transportadores. A concentração na metade da velocidade máxima é igual à constante de ligação (K_m) do carreador para o soluto ($V_{máx}$, taxa máxima).

Os **hormônios** podem regular a difusão facilitada ao modificar o número de transportadores disponíveis. A **insulina**, por meio de uma via de sinalização complexa, aumenta o transporte da glicose no tecido adiposo e no músculo por meio do recrutamento de transportadores da glicose (GLUT) do reservatório intracelular. A insulina também aumenta o transporte de aminoácidos no fígado e em outros tecidos. Uma das ações coordenadas dos **hormônios glicocorticoides** consiste em aumentar o transporte de aminoácidos para o fígado, onde eles servem de substrato para a gliconeogênese. O **hormônio do crescimento** eleva o transporte de aminoácidos em todas as células, enquanto os **estrogênios** exercem a mesma função no útero. Nas células animais, existem pelo menos cinco sistemas de transportadores diferentes para os aminoácidos. Cada um desses sistemas é específico para um grupo de aminoácidos estreitamente relacionados, e a maioria opera como sistemas de simporte de Na^+ (Figura 40-12).

Os canais iônicos são proteínas transmembrana que permitem a entrada seletiva de vários íons

As membranas naturais contêm canais transmembrana, isto é, estruturas semelhantes a poros compostas de proteínas que constituem **canais iônicos** seletivos. Os canais que transportam cátions têm um diâmetro médio de cerca de 5 a 8 nm. A **permeabilidade** de um canal depende do tamanho, do grau de hidratação e da densidade de cargas do íon. Foram identificados **canais específicos** para o Na^+, K^+, Ca^{2+} e Cl^-. Um **canal de Na^+** desse tipo está ilustrado na **Figura 40-15**. Esse canal consiste em quatro subunidades. Cada subunidade é constituída de seis domínios transmembrana α-helicoidais. As extremidades

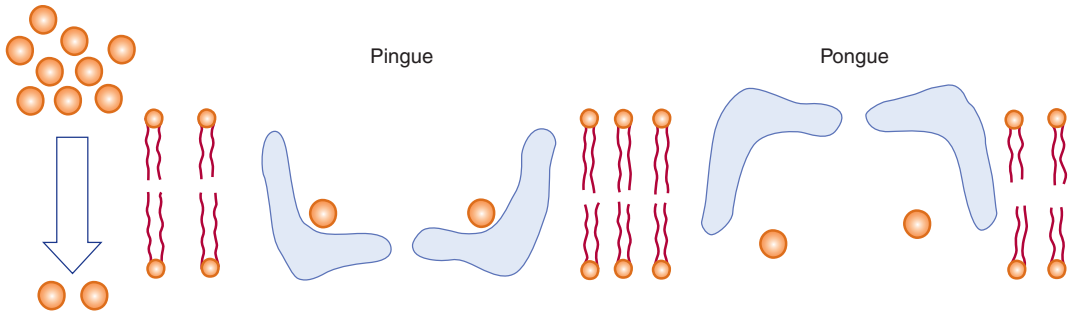


FIGURA 40-14 O modelo de "pingue-pongue" da difusão facilitada. Uma proteína carreadora (estrutura azul) presente na bicamada lipídica associa-se a um soluto em alta concentração em um lado da membrana. Ocorre uma alteração de conformação ("pingue" para "pongue"), e o soluto é descarregado no lado que favorece o novo equilíbrio. Em seguida, o carreador vazio readquire a conformação original ("pongue" para "pingue") para completar o ciclo.

aminoterminal e carboxiterminal localizam-se no citoplasma, e existem alças tanto extracelulares quanto intracelulares. O poro propriamente dito do canal através do qual os íons passam não está ilustrado. O poro constitui o centro (com diâmetro de cerca de 5 a 8 nm) de uma estrutura formada pela aposição das subunidades. Os canais iônicos são muito **seletivos** e, na maioria dos casos, permitem a passagem de apenas um tipo de íon (Na^+, Ca^{2+}, etc). O **filtro de seletividade** dos canais de K^+ é constituído de um anel grupos carbonil doados pelas subunidades. Os grupos carbonil deslocam a água ligada do íon e, portanto, restringem o seu tamanho para dimensões precisas apropriadas para a sua passagem pelo canal. Existem muitas variações na estrutura anteriormente descrita, porém todos os canais iônicos são basicamente formados de subunidades transmembrana, que se reúnem para formar um poro central através do qual os íons passam seletivamente.

As membranas das **células nervosas** contêm canais iônicos bem estudados, que são responsáveis pela geração dos potenciais de ação. A atividade de alguns desses canais é controlada por neurotransmissores; consequentemente, a atividade do canal pode ser **regulada**.

Os canais iônicos abrem-se transitoriamente e, portanto, são "**regulados**". Os portões podem ser controlados por abertura ou fechamento. Nos **canais regulados por ligantes**, uma molécula específica liga-se a um receptor e abre o canal. Os **canais regulados por voltagem** abrem-se (ou fecham-se) em resposta a mudanças no potencial de membrana. Os canais **regulados mecanicamente** respondem a estímulos mecânicos (pressão e toque).

As **Tabelas 40-4** e **40-5** fornecem uma lista de algumas propriedades dos canais iônicos; outros aspectos desses canais são discutidos de modo sucinto no Capítulo 48.

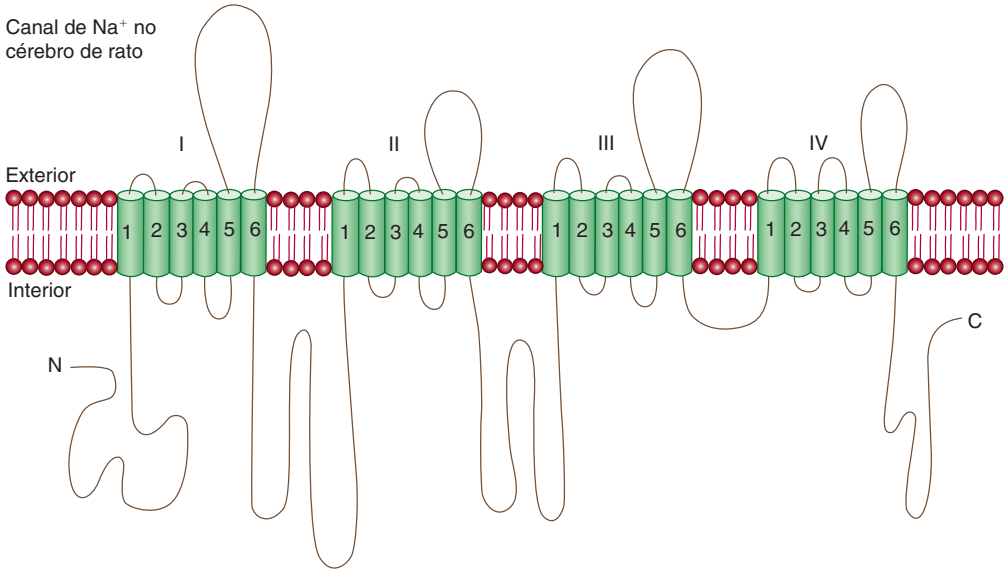


FIGURA 40-15 Representação esquemática das estruturas de um canal iônico (canal de Na^+ no cérebro de rato). Os algarismos romanos indicam as quatro subunidades do canal, enquanto os algarismos arábicos indicam os domínios transmembrana α-helicoidais de cada subunidade. O poro propriamente dito, através do qual os íons (Na^+) passam, não está ilustrado, porém é formado pela aposição das várias subunidades. As áreas específicas das subunidades envolvidas na abertura e no fechamento do canal também não estão representadas. (De WK Catterall. Modificada e reproduzida, com autorização, de Hall ZW: *An introduction to Molecular Neurobiology.* Sinauer, 1992.)

TABELA 40-5 Algumas propriedades dos canais iônicos

• São constituídos de subunidades de proteínas transmembrana.
• A maioria é altamente seletiva para determinado íon; alguns não são seletivos.
• Permitem que íons impermeáveis atravessem as membranas em uma taxa que se aproxima dos limites da difusão.
• Podem permitir fluxos iônicos de 10^6 a 10^7/s.
• Suas atividades são reguladas.
• Os principais tipos são canais regulados por voltagem, regulados por ligantes e mecanicamente regulados.
• Em geral, são altamente conservados entre as espécies.
• A maioria das células tem uma variedade de canais de Na^+, K^+, Ca^{2+} e Cl^-.
• As mutações nos genes os codificam podem causar doenças específicas.[1]
• Suas atividades são afetadas por determinados fármacos.

[1]Algumas doenças causadas por mutações dos canais iônicos são descritas de modo sucinto no Capítulo 49.

Os estudos detalhados de um canal de K^+ e de um canal regulado por voltagem contribuíram para um melhor conhecimento de suas ações

Existem pelo menos **quatro aspectos** dos canais iônicos que precisam ser elucidados: (1) suas estruturas gerais; (2) como eles conduzem tão rapidamente os íons; (3) sua seletividade; e (4) suas propriedades de controle. Conforme descrito adiante, foram realizados progressos consideráveis na solução dessas difíceis questões.

Houve um progresso particular com a pesquisa de Roderick MacKinnon, que recebeu o Prêmio Nobel por elucidar a estrutura e a função de um **canal de K^+** (KvAP) existente no *Streptomyces lividans*. Foram usadas diversas técnicas, incluindo mutagênese de locais específicos e cristalografia por raios X. O canal é uma proteína integral de membrana, constituída de quatro subunidades idênticas, cada uma delas com dois segmentos transmembrana, criando uma estrutura semelhante a uma tenda indígena invertida (**Figura 40-16**). A parte dos canais que confere seletividade iônica (**filtro de seletividade**) mede 12 Å de comprimento (um comprimento relativamente curto da membrana, de modo que o K^+ não precisa percorrer uma distância demasiado longa na membrana) e localiza-se na extremidade larga da tenda invertida. A cavidade grande preenchida de água e os dipolos helicoidais mostrados na Figura 40-16 ajudam a superar a barreira de energia eletrostática relativamente grande para que o cátion atravesse a membrana. O **filtro de seletividade** é revestido por átomos de oxigênio carbonílico (provenientes de uma sequência TVGYG), assegurando um número de sítios com os quais o K^+ pode interagir. Os íons K^+, que sofrem desidratação à medida que entram no filtro estreito de seletividade, encaixam-se com coordenação apropriada no filtro, enquanto o Na^+ é pequeno demais para interagir com os átomos de oxigênio carbonílicos em alinhamento correto, sendo consequentemente rejeitado. Dois íons K^+, quando próximos um do outro no filtro, se repelem. Essa repulsão supera as interações

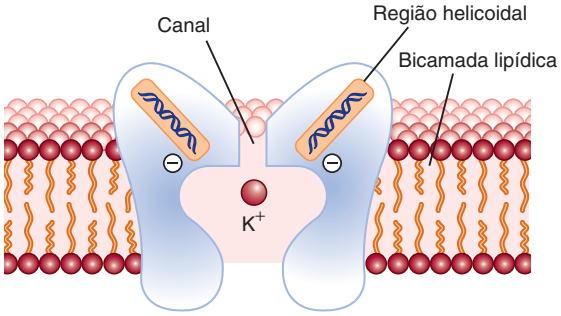


FIGURA 40-16 Ilustração esquemática da estrutura de um canal de K^+ (KvAP) do *Streptomyces lividans*. Um único K^+ está ilustrado em uma grande cavidade aquosa dentro da membrana interna. As duas regiões helicoidais da proteína do canal estão orientadas com suas extremidades de carboxilato em direção ao local onde se encontra o K^+. O canal está revestido por oxigênio carboxílico. (Modificada, com autorização, de Doyle DA, et al., (1998), "The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K^+ Conduction and Selectivity". Science 280:69. Reimpressa com autorização de AAAS.)

entre o K^+ e a molécula proteica circundante e possibilita uma condução muito rápida do K^+ com alta seletividade.

Outros estudos com um **canal iônico regulado por voltagem** (HvAP) do *Aeropyrum pernix* revelaram muitos aspectos de seus mecanismos sensores e regulados por voltagem. Esse canal é constituído de quatro subunidades, cada uma com seis segmentos transmembrana. Um dos seis segmentos (S4 e parte do S3) é o sensor de voltagem. Comporta-se como uma **pá eletricamente carregada** (**Figura 40-17**), visto que pode mover-se pelo interior da membrana, transferindo quatro cargas positivas (devido a quatro resíduos de Arg em cada subunidade) de uma superfície da membrana para a outra em resposta a mudanças da voltagem. Existem quatro sensores de voltagem em cada canal, ligados ao portão. A parte do portão do canal é formada de hélices S6 (uma de cada subunidade). Os movimentos dessa parte do canal em resposta a uma mudança da

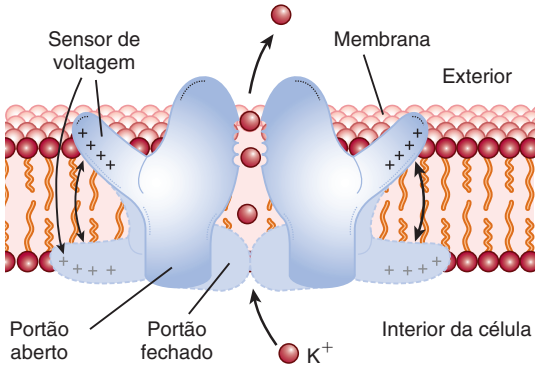


FIGURA 40-17 Ilustração esquemática do canal de K^+ regulado por voltagem do *Aeropyrum pernix*. Os sensores de voltagem comportam-se como pás eletricamente carregadas que se movem pelo interior da membrana. Quatro sensores de voltagem (apenas dois estão ilustrados aqui) estão ligados mecanicamente ao portão do canal. Cada sensor tem quatro cargas positivas geradas pelos resíduos de arginina. (Modificada, com autorização, de Sigworth FJ: Nature 2003;423:21. Copyright © 2003. Macmillan Publishers Ltd.)

voltagem fecham efetivamente o canal ou o reabrem, permitindo, neste último caso, a passagem de uma corrente de íons.

Os ionóforos são moléculas que atuam como transportadores bidirecionais para vários íons

Certos micróbios sintetizam moléculas orgânicas cíclicas pequenas, os **ionóforos, como a valinomicina**, que funcionam como transportadores bidirecionais para o movimento de íons (K^+ no caso da valinomicina) através da membrana. Esses ionóforos contêm centros hidrofílicos que se ligam a íons específicos e são circundados por regiões hidrofóbicas periféricas; essa disposição possibilita a dissolução efetiva das moléculas na membrana e a sua difusão transversal. Outros, como o polipeptídeo bem estudado conhecido como **gramicidina** (um antibiótico), dobram-se para formar canais ocos.

As toxinas microbianas, como a **toxina diftérica**, e os **componentes do complemento sérico** ativados podem produzir grandes poros nas membranas celulares, permitindo, assim, que as macromoléculas tenham acesso direto ao meio interno. A toxina **α-hemolisina** (produzida por certas espécies de *Streptococcus*) consiste em sete subunidades que se reúnem para formar um barril β, que permite o extravasamento de metabólitos, como o ATP, das células, resultando em lise celular.

As aquaporinas são proteínas que formam canais de água em determinadas membranas

Em algumas células (p. ex., eritrócitos e células dos dúctulos coletores do rim), o movimento de água por difusão simples é intensificado pelo seu movimento por meio de **canais de água**. Esses canais são constituídos de proteínas transmembrana tetraméricas, denominadas **aquaporinas**. Foram identificadas pelo menos 10 aquaporinas distintas (AP-1 a AP-10). Estudos cristalográficos, entre outros, revelaram como esses canais possibilitam a passagem de água, porém excluem a passagem de íons e de prótons. Em essência, os poros são muito estreitos para permitir a passagem de íons. Os prótons são excluídos, visto que o átomo de oxigênio da água liga-se a dois resíduos de asparagina que revestem o canal, tornando a água indisponível para a sua participação em um revezamento de H^+ e impedindo, assim, a entrada de prótons. Foi constatado que a ocorrência de mutações no gene que codifica a AP-2 constitui a causa de um tipo de **diabetes insípido nefrogênico**, distúrbio caracterizado pela incapacidade de concentrar a urina. Peter Agre ganhou o Prêmio Nobel pelo seu trabalho sobre a estrutura e a função das aquaporinas.

OS SISTEMAS DE TRANSPORTE ATIVO NECESSITAM DE UMA FONTE DE ENERGIA

O processo de transporte ativo difere da difusão, visto que as moléculas são transportadas contra gradientes de concentração, razão pela qual **há necessidade de energia**. Essa energia pode derivar da **hidrólise do ATP**, do **movimento de elétrons** ou da **luz**. A manutenção dos gradientes eletroquímicos nos sistemas biológicos é tão importante que consome aproximadamente **30% do gasto energético total** de uma célula.

Como mostra a **Tabela 40-6**, foram identificadas **quatro classes principais** de transportadores ativos impulsionados pelo ATP (**transportadores P, F, V e ABC**). A nomenclatura é explicada na legenda da Tabela. O primeiro exemplo da classe P, a Na^+-K^+-ATPase é discutida adiante. A Ca^{2+} ATPase do músculo é discutida no Capítulo 48. A segunda classe é designada como tipo F. O exemplo mais importante dessa classe é a **ATP sintase mt**, descrita no Capítulo 13. Os transportadores ativos do tipo V bombeiam prótons nos lisossomos e em outras estruturas. Os transportadores ABC incluem a **proteína CFTR**, um canal de cloreto envolvido na etiologia da fibrose cística (descrita mais adiante, neste capítulo, bem como no Capítulo 54). Outro membro importante dessa classe é a **proteína de resistência a múltiplas drogas 1** (proteína MDR-1). Esse transportador bombeia uma variedade de fármacos, incluindo muitos agentes antineoplásicos, para fora das células. Constitui uma causa muito importante de **resistência** das células cancerosas **à quimioterapia**, embora muitos outros mecanismos também estejam implicados.

A Na^+-K^+-ATPase da membrana plasmática é uma enzima fundamental na regulação das concentrações intracelulares de Na^+ e K^+

Em geral, as células mantêm uma **baixa** concentração intracelular de Na^+ e uma **alta** concentração intracelular de K^+ (Tabela 40-1), juntamente com um potencial elétrico negativo efetivo no interior. A bomba que mantém esses gradientes iônicos é uma **ATPase**, que é ativada por Na^+ e K^+ (Na^+-K^+-ATPase; ver **Figura 40-18**). Ela bombeia três Na^+ para fora das células e dois K^+ para dentro. A ATPase é uma proteína de membrana integral que contém um domínio transmembrana, que permite a passagem de íons, e domínios citosólicos que acoplam a hidrólise do ATP ao transporte. Possui centros catalíticos para o ATP e o Na^+ no lado citoplasmático (interno) da membrana plasmática (MP), enquanto os sítios de ligação de K^+ estão localizados no lado extracelular da membrana. A fosforilação pelo ATP induz uma **mudança na conformação** da

TABELA 40-6 Principais tipos de transportadores ativos impulsionados pelo ATP

Tipo	Exemplo com localização subcelular
Tipo P	Ca^{2+} ATPase (RE); Na^+-K^+-ATPase (MP)
Tipo F	ATP-sintase mt da fosforilação oxidativa
Tipo V	A ATPase que bombeia prótons nos lisossomos e vesículas sinápticas
Transportador ABC	Proteína CFTR (MP); proteína MDR-1 (MP)

P (no tipo P) refere-se à fosforilação (essas proteínas se autofosforilam).
F (no tipo F) indica fatores de acoplamento da energia.
V (no tipo V) significa vacuolar.
ABC refere-se ao transportador de cassete de ligação ao ATP (todos apresentam dois domínios de ligação de nucleotídeos e dois segmentos transmembrana)
RE, retículo sarcoplasmático do músculo; MP, membrana plasmática; mt, mitocondrial; CFTR, proteína reguladora transmembrana da fibrose cística, um transportador de Cl^- e a proteína implicada na causa da fibrose cística (ver essa doença neste capítulo, bem como no Capítulo 57); proteína MDR-1 (proteína de resistência a múltiplas drogas 1), uma proteína que bombeia numerosos agentes quimioterápicos para fora das células cancerosas, representando, portanto, um importante fator que contribui para a resistência de certas células cancerosas ao tratamento.

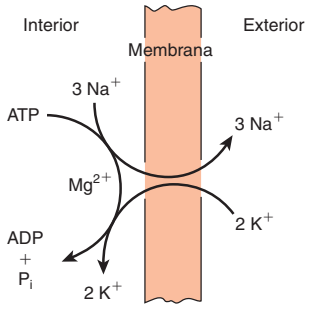


FIGURA 40-18 Estequiometria da bomba de Na^+-K^+-ATPase. Esta bomba transfere três íons Na^+ de dentro para fora da célula e transporta dois íons K^+ de fora para dentro da célula, para cada molécula de ATP hidrolisada em ADP pela ATPase associada à membrana. A ouabaína e outros glicosídeos cardíacos inibem esta bomba ao atuar na superfície extracelular da membrana. (Cortesia de R Post.)

proteína, levando à transferência de três íons Na^+ do lado interno para o lado externo da MP. Duas moléculas de K^+ ligam-se a sítios da proteína na superfície externa da MP, resultando em desfosforilação da proteína e transferência dos íons K^+ através da membrana para o interior. Assim, três íons Na^+ são transportados para o exterior para cada dois íons K^+ que entram. Isso cria um desequilíbrio de carga elétrica entre o interior e o exterior da célula, tornando o **interior mais negativo** (efeito **eletrogênico**). A **ouabaína** ou os **digitálicos** (dois fármacos cardíacos importantes) inibem essa ATPase pela sua ligação ao domínio extracelular. Essa enzima pode consumir ~30% da energia celular. A Na^+-K^+-ATPase pode ser **acoplada** a vários outros transportadores, como aqueles envolvidos no transporte da glicose (ver adiante).

A TRANSMISSÃO DE IMPULSOS NERVOSOS ENVOLVE OS CANAIS IÔNICOS E AS BOMBAS

A membrana que circunda as **células neuronais** mantém uma assimetria de voltagem entre o interior e o exterior (potencial elétrico) e também é **eletricamente excitável**, devido à presença de canais regulados por voltagem. Quando apropriadamente estimulados por um sinal químico mediado por um receptor específico da membrana sináptica (ver discussão sobre a transmissão de sinais bioquímicos adiante), os canais na membrana são abertos para permitir o rápido influxo de Na^+ ou Ca^{2+} (com ou sem efluxo de K^+), de modo que a diferença de voltagem desaparece rapidamente, e esse segmento da membrana é despolarizado. Todavia, em virtude da ação das bombas iônicas na membrana, o gradiente é rapidamente restabelecido.

Quando grandes áreas da membrana são **despolarizadas** dessa maneira, o distúrbio eletroquímico propaga-se de forma semelhante a uma onda ao longo da membrana, gerando um **impulso nervoso**. As **bainhas de mielina**, formadas pelas células de Schwann, enrolam-se ao redor das fibras nervosas e proporcionam um **isolante elétrico** que circunda a maior parte do nervo e acelera acentuadamente a propagação da onda (sinal), permitindo a entrada e saída de íons da membrana apenas nos pontos em que ela não tem isolamento (nos nodos de Ranvier). A membrana de mielina apresenta um elevado conteúdo de **lipídeos**, o que explica a sua propriedade de excelente isolante. Existem quantidades relativamente pequenas de proteínas na membrana mielínica, e as presentes parecem manter unidas várias bicamadas da membrana para formar a estrutura isolante hidrofóbica que é impermeável aos íons e à água. **Algumas doenças**, como, por exemplo, a esclerose múltipla e a síndrome de Guillain-Barré, caracterizam-se por desmielinização e comprometimento da condução nervosa.

O TRANSPORTE DA GLICOSE ENVOLVE VÁRIOS MECANISMOS

Uma descrição do **transporte da glicose** resume muitos dos aspectos comentados neste capítulo. A glicose precisa entrar nas células como primeira etapa na utilização de energia. Vários transportadores de glicose (GLUT) diferentes estão envolvidos, variando nos diferentes tecidos (ver Tabela 20-2). Nos **adipócitos e no músculo esquelético**, a glicose entra por um sistema de transporte específico (GLUT4), que é potencializado pela insulina. Alterações no transporte são causadas basicamente por alterações da $V_{máx}$ (presumivelmente por um maior ou menor número de transportadores), porém alterações de K_m também podem estar envolvidas.

O transporte da glicose **no intestino delgado** envolve alguns aspectos diferentes dos princípios de transporte discutidos anteriormente. A glicose e o Na^+ ligam-se a sítios diferentes de um **transportador simporte de Na^+-glicose** localizado na **superfície apical**. O Na^+ entra na célula ao longo de seu gradiente eletroquímico e "arrasta" a glicose com ele (**Figura 40-19**). Por conseguinte, quanto maior o gradiente de Na^+, mais glicose irá entrar; e, se a concentração de Na^+ no líquido extracelular estiver

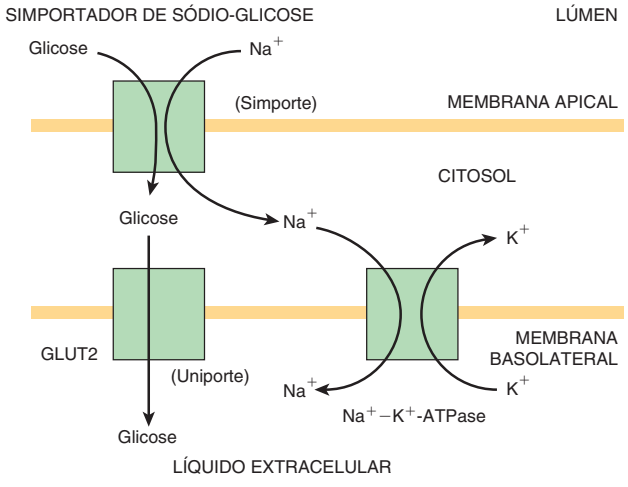


FIGURA 40-19 O movimento transcelular da glicose em uma célula intestinal. A glicose acompanha o Na^+ por meio da membrana epitelial luminal. O gradiente de Na^+ que impulsiona esse simporte é estabelecido pela troca de Na^+-K^+, que ocorre na membrana basal voltada para o compartimento do líquido extracelular, pela ação da Na^+-K^+-ATPase. A glicose em altas concentrações dentro da célula segue um movimento a favor do gradiente para o líquido extracelular por difusão facilitada (mecanismo uniporte), por meio da GLUT2 (um transportador de glicose, ver Tabela 20-2). O simporte de sódio-glicose transporta efetivamente 2 Na^+ para cada glicose.

baixa, o transporte de glicose é interrompido. Para manter um gradiente de Na^+ elevado, esse transportador simporte de Na^+-glicose depende dos gradientes gerados pela **Na^+-K^+-ATPase**, que mantém uma concentração intracelular baixa de Na^+. Mecanismos semelhantes são utilizados para transportar **outros açúcares**, bem como **aminoácidos**, por meio da luz apical nas células polarizadas, como aquelas encontradas no intestino e no rim. Nesse caso, o movimento transcelular de glicose envolve outro componente: um transportador (Figura 40-19), que permite que a glicose acumulada no interior da célula atravesse a **membrana basolateral**, envolvendo um **uniporte de glicose** (GLUT2).

O tratamento de casos graves de **diarreia** (como a que ocorre no cólera) baseia-se nas informações anteriores. No **cólera** (ver Capítulo 57), quantidades maciças de líquido podem ser eliminadas na forma de fezes aquosas em um intervalo de tempo muito curto, resultando em grave desidratação e, possivelmente, morte. A **terapia de reidratação oral**, que consiste principalmente em **NaCl e glicose**, foi desenvolvida pela Organização Mundial da Saúde (OMS). O transporte da glicose e do Na^+ por meio do epitélio intestinal força (por osmose) a transferência de água do lúmen intestinal para dentro das células intestinais, resultando em reidratação. A glicose ou o NaCl isoladamente não seriam efetivos.

AS CÉLULAS TRANSPORTAM DETERMINADAS MACROMOLÉCULAS ATRAVÉS DA MEMBRANA PLASMÁTICA POR ENDOCITOSE E POR EXOCITOSE

O processo pelo qual as células captam moléculas grandes é conhecido como **endocitose**. Algumas dessas moléculas (p. ex., polissacarídeos, proteínas e polinucleotídeos), quando hidrolisadas dentro da célula, **produzem nutrientes**. A endocitose também proporciona um mecanismo para **regular** o teor de determinados componentes da membrana, sendo os receptores de hormônios um exemplo típico. A endocitose pode ser utilizada para entender melhor como as células funcionam. O DNA de um tipo celular pode ser utilizado para transfectar outra célula e alterar a sua função ou o seu fenótipo. Com frequência, utiliza-se um gene específico nesses experimentos, fornecendo uma maneira singular de estudar e analisar a regulação desse gene. A **transfecção do DNA** depende da endocitose, que é responsável pela entrada do DNA no interior da célula. Em geral, esses experimentos empregam fosfato de cálcio, visto que o Ca^{2+} estimula a endocitose e precipita o DNA, tornando-o mais apropriado para o processo de endocitose. As células também **liberam macromoléculas** por **exocitose**. Tanto a endocitose quanto a exocitose envolvem a formação de vesículas com ou a partir da membrana plasmática.

A endocitose envolve a ingestão de partes da membrana plasmática

Quase todas as células eucarióticas estão reciclando continuamente partes de suas membranas plasmáticas. As vesículas endocitóticas são geradas quando segmentos da membrana plasmática se invaginam, englobando um pequeno volume de líquido extracelular e seu conteúdo. Em seguida, a vesícula desprende-se à medida que a fusão das membranas plasmáticas veda o colo da vesícula no local original da invaginação (**Figura 40-20**). Essa vesícula funde-se com outras estruturas da membrana e, assim, possibilita o transporte de seu conteúdo para outros compartimentos celulares ou até mesmo de volta para o exterior da célula. As vesículas endocitóticas fundem-se, em sua maioria, com **lisossomos primários** para formar **lisossomos secundários**, que contêm enzimas hidrolíticas e representam, portanto, organelas especializadas para distribuição intracelular. As macromoléculas contidas nessas vesículas são digeridas, produzindo aminoácidos, açúcares simples ou nucleotídeos, que são transportados para fora das vesículas e reutilizados pela célula. A endocitose requer (1) energia, habitualmente proveniente da hidrólise do ATP; (2) Ca^{2+}; e (3) elementos contráteis na célula (provavelmente o sistema de microfilamentos) (Capítulo 48).

Existem **dois** tipos gerais de endocitose. A **fagocitose** ocorre apenas em células especializadas, como os macrófagos e os granulócitos. Ela envolve a ingestão de partículas grandes, como vírus, bactérias, células ou restos celulares. Os macrófagos são extremamente ativos nesse aspecto e podem ingerir 25% de seu volume por hora. Nesse processo, um macrófago pode internalizar 3% de sua membrana plasmática por minuto ou toda a membrana a cada 30 minutos.

A **pinocitose** ("célula que bebe") constitui uma propriedade de todas as células e possibilita a captação celular de líquidos e de conteúdo líquido. Existem **dois tipos** de pinocitose. A **pinocitose de fase líquida** é um processo não seletivo, em que a captação de um soluto pela formação de pequenas vesículas é simplesmente proporcional à sua concentração no líquido extracelular circundante. A formação dessas vesículas é um processo extremamente

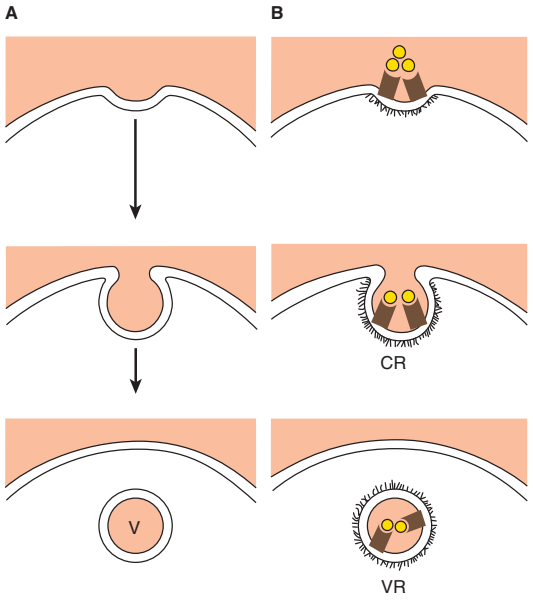


FIGURA 40-20 Dois tipos de pinocitose. A vesícula endocitótica (V) forma-se em consequência da invaginação de uma parte da membrana plasmática. A pinocitose de fase líquida (**A**) é aleatória e não direcionada. A endocitose absortiva (mediada por receptor) (**B**) é seletiva e ocorre em cavidades revestidas (CR), cujo revestimento consiste na proteína clatrina (o material difuso). A especificidade do alvo é assegurada pelos receptores (símbolos marrons), que são específicos para uma variedade de moléculas. Isso leva à formação de uma vesícula revestida (VR) internalizada.

ativo. Por exemplo, os fibroblastos internalizam a sua membrana plasmática em uma taxa de cerca de um terço daquela dos macrófagos. Esse processo ocorre mais rapidamente do que a produção das membranas. A área de superfície e o volume de uma célula não se alteram muito, de modo que as membranas precisam ser repostas por exocitose ou por reciclagem tão rápida quanto a sua remoção por endocitose.

O outro tipo de pinocitose, conhecida como **pinocitose absortiva** ou **endocitose mediada por receptor**, é principalmente responsável pela captação de macromoléculas específicas para as quais existem sítios de ligação na membrana plasmática. Esses receptores de alta afinidade permitem a concentração seletiva de ligantes provenientes do meio, minimizam a captação de líquido ou de macromoléculas livres solúveis e aumentam acentuadamente a taxa de entrada de moléculas específicas na célula. As **vesículas** formadas durante a pinocitose absortiva derivam de invaginações (cavidades) recobertas, no lado citoplasmático, por um material filamentoso, que são apropriadamente designadas como **vesículas revestidas**. Em muitos sistemas, a proteína **clatrina** é um material filamentar. Possui uma estrutura constituída de três pernas (denominada **trisquélio**), em que cada uma das pernas é formada por uma cadeia leve e uma cadeia pesada de clatrina. A polimerização da clatrina dentro de uma vesícula é controlada por **partículas de montagem**, compostas de quatro **proteínas adaptadoras**. Essas proteínas interagem com determinadas sequência de aminoácidos dos receptores que se tornam carregados, assegurando a seletividade da captação. O lipídeo **fosfatidilinositol 4,5-bifosfato** (PIP_2) (ver Capítulo 15) também desempenha um papel importante na montagem das vesículas. Além disso, a proteína **dinamina**, que se liga ao GTP e o hidrolisa, é necessária para o desprendimento das vesículas revestidas por clatrina da superfície celular. As cavidades revestidas podem constituir até 2% da superfície de algumas células. Outros aspectos das vesículas são discutidos no Capítulo 46.

Por exemplo, a molécula de **lipoproteína de baixa densidade** (LDL) e seu **receptor** (Capítulo 25) são internalizados por meio de cavidades revestidas contendo o receptor de LDL. Essas vesículas endocitóticas que contêm LDL e seu receptor fundem-se com lisossomos da célula. O receptor é liberado e reciclado, retornando à membrana da superfície celular, enquanto a apoproteína da LDL é degradada, e os ésteres de colesterol são metabolizados. A síntese do receptor de LDL é regulada pelas consequências secundárias ou terciárias da pinocitose, como, por exemplo, pelos produtos metabólicos – como o colesterol – liberados durante a degradação das LDL. Os distúrbios do receptor de LDL e de sua internalização são clinicamente importantes e são discutidos nos Capítulos 25 e 26.

A pinocitose absortiva das **glicoproteínas extracelulares** exige que essas glicoproteínas transportem sinais de reconhecimento específicos de carboidratos. Esses sinais de reconhecimento são ligados por moléculas receptoras da membrana, que desempenham um papel análogo ao receptor de LDL. Um **receptor de galactosil** existente na superfície dos hepatócitos é fundamental na pinocitose absortiva de **assialoglicoproteínas** da circulação (Capítulo 47). As **hidrolases ácidas** captadas por pinocitose absortiva nos fibroblastos são reconhecidas pelas suas frações de **manose-6-fosfato**. É interessante assinalar que a fração de manose-6-fosfato também parece desempenhar um papel importante no direcionamento intracelular das hidrolases ácidas para os lisossomos das células nos quais são sintetizadas (Capítulo 47).

Existe uma **consequência desvantajosa** no processo de endocitose mediada por receptor, visto que os **vírus** que causam doenças como a hepatite (que acomete as células hepáticas), a poliomielite (que afeta os neurônios motores) e a Aids (que acomete as células T) iniciam o processo de lesão com a sua entrada nas células por esse mecanismo. A **toxicidade do ferro** também começa com a captação excessiva de ferro por endocitose.

A exocitose libera determinadas macromoléculas das células

A maioria das células **libera** macromoléculas no exterior por **exocitose**. Esse processo também está envolvido na remodelação da membrana, quando os componentes sintetizados no RE e no aparelho de Golgi são transportados em vesículas, que se fundem com a membrana plasmática. O **sinal** para a ocorrência de exocitose é, com frequência, um hormônio que, quando se liga a um receptor de superfície celular induz uma alteração local e transitória na concentração de Ca^{2+}. O $\mathbf{Ca^{2+}}$ desencadeia o processo de exocitose. A **Figura 40-21** fornece uma comparação entre os mecanismos de exocitose e de endocitose.

As moléculas liberadas por exocitose têm, pelo menos, **três destinos**. (1) São proteínas de membrana, que permanecem associadas à superfície celular. (2) Passam a fazer parte da matriz extracelular, como, por exemplo, o colágeno e os glicosaminoglicanos. (3) Podem entrar no líquido extracelular e sinalizar outras células. A insulina, o paratormônio e as catecolaminas são acondicionados em grânulos e processados no interior das células, sendo liberados com estimulação apropriada.

VÁRIOS SINAIS SÃO TRANSMITIDOS POR MEIO DAS MEMBRANAS

Sinais bioquímicos específicos, como os neurotransmissores, hormônios e imunoglobulinas, ligam-se a receptores específicos (proteínas integrais) expostos no lado externo das membranas celulares e transmitem informações por meio dessas membranas ao citoplasma. Esse processo, denominado **sinalização transmembrana** (ver Capítulo 42), envolve a formação de diversas moléculas de sinalização, incluindo nucleotídeos cíclicos, cálcio, fosfoinositídeos e diacilglicerol. Muitas dessas etapas envolvem a **fosforilação** dos receptores e proteínas de localização distal.

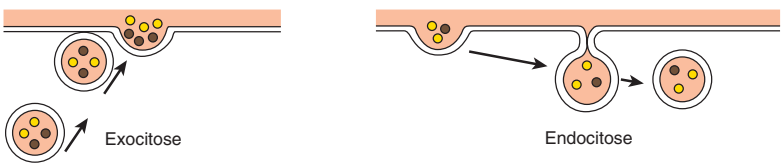


FIGURA 40-21 Comparação entre os mecanismos de endocitose e exocitose. A exocitose envolve o contato de duas monocamadas da superfície interna (lado citoplasmático), enquanto a endocitose resulta do contato de duas monocamadas da superfície externa.

AS JUNÇÕES COMUNICANTES POSSIBILITAM O FLUXO DIRETO DAS MOLÉCULAS DE UMA CÉLULA PARA OUTRA

As junções comunicantes são estruturas que permitem a **transferência direta de moléculas pequenas** (até ~1.200 Da) de uma célula para outra adjacente. Essas estruturas são constituídas de uma família de proteínas, denominadas **conexinas**, que formam uma estrutura hexagonal, que consiste em 12 dessas proteínas. Seis conexinas formam um hemicanal de conexina e ligam-se a uma estrutura semelhante da célula adjacente, produzindo um **canal de conéxon completo** (**Figura 40-22**). Uma junção comunicante contém vários conéxons. Diversas conexinas são encontradas em diferentes tecidos. Foi constatado que as **mutações** dos genes que codificam as conexinas estão associadas a diversos distúrbios, incluindo anormalidades cardiovasculares, um tipo de surdez e a forma ligada ao X da doença de Charcot-Marie-Tooth (um distúrbio neurológico desmielinizante).

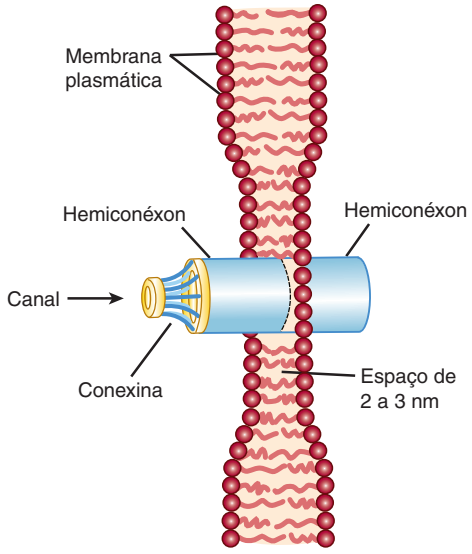


FIGURA 40-22 Ilustração esquemática de uma junção comunicante. Um conéxon é formado por dois hemiconéxons. Cada hemiconéxon é constituído de seis moléculas de conexina. Os solutos pequenos podem difundir-se através do canal central, proporcionando um mecanismo direto de comunicação intercelular.

AS MUTAÇÕES QUE AFETAM AS PROTEÍNAS DE MEMBRANA CAUSAM DOENÇAS

Como as membranas são encontradas em muitas organelas e estão envolvidas em numerosos processos, não é surpreendente constatar que as **mutações** que afetam seus constituintes proteicos resultem em muitas doenças ou distúrbios. Enquanto algumas mutações afetam diretamente a função das proteínas de membrana, a maioria das mutações provoca dobramento defeituoso das proteínas e compromete a transferência (ver Capítulo 46) das proteínas de membrana de seu local de síntese no RE até a membrana plasmática ou outros locais intracelulares. A **Tabela 40-7** fornece exemplos de doenças ou distúrbios decorrentes de anormalidades nas proteínas de membrana. Essas anormalidades refletem principalmente mutações em proteínas da **membrana plasmática**, entre as quais uma afeta a **função dos lisossomos** (doença da célula I).

As proteínas das **membranas plasmáticas** podem ser classificadas em **receptores**, **transportadores**, **canais iônicos**, **enzimas** e **componentes estruturais**. Os membros de todas essas classes são frequentemente **glicosilados**, de modo que as mutações que afetam esse processo (ver Capítulo 47) podem alterar a sua função. As mutações que ocorrem nos **receptores** podem causar defeitos na sinalização transmembrana, um evento comum no **câncer** (ver Capítulo 55). Muitas **doenças genéticas** ou distúrbios foram atribuídos a mutações que afetam várias proteínas que atuam no **transporte** de aminoácidos, açúcares, lipídeos, urato, ânions, cátions, água e vitaminas através da **membrana plasmática**.

As mutações nos genes que codificam proteínas em **outras membranas** também podem ter consequências deletérias. Assim, por exemplo, a ocorrência de mutações em genes que codificam as **proteínas das membranas mitocondriais** envolvidas na fosforilação oxidativa pode causar distúrbios neurológicos e outros problemas (p. ex., neuropatia óptica hereditária de Leber, NOHL; **em 2008, foi relatado algum sucesso da terapia gênica no tratamento dessa doença**.)

As proteínas das membranas também podem ser afetadas por **outras anormalidades além das mutações**. A produção de **autoanticorpos** contra o receptor de acetilcolina no músculo esquelético provoca miastenia grave. A **isquemia** pode comprometer rapidamente a integridade de vários canais iônicos nas membranas. A **superexpressão** da P-glicoproteína (MDR-1), uma bomba de fármacos, resulta em resistência a múltiplos fármacos (RMF) em células cancerosas. As anormalidades observadas em outros constituintes da membrana, além das proteínas, também podem ser prejudiciais. Quanto aos **lipídeos**, o excesso de colesterol (p. ex., na hipercolesterolemia familiar), de lisofosfolipídeos (p. ex., após picadas de determinadas serpentes, cujos venenos contêm fosfolipases) ou de glicoesfingolipídeos (p. ex., na esfingolipidose) pode afetar a função da membrana.

A fibrose cística é causada por mutações no gene que codifica o CFTR, um transportador de cloreto

A fibrose cística (FC) é um distúrbio genético **recessivo**, prevalente entre brancos na América do Norte e em certas regiões da Europa Setentrional. Caracteriza-se por infecções bacterianas crônicas das vias respiratórias e dos seios da face, má digestão de gordura devido à insuficiência do pâncreas exócrino, infertilidade masculina em consequência do desenvolvimento anormal do ducto deferente e **níveis elevados de cloreto no suor** (>60 mmol/L). Em 1989, foi demonstrado que mutações no gene que codifica uma proteína denominada **proteína reguladora transmembrana da fibrose cística** (**CFTR**) era responsável pela FC. A proteína CFTR é um **transportador de Cl^- regulado pelo AMP cíclico**. As principais manifestações clínicas da FC e outras informações sobre o gene responsável pela doença e sobre o CFTR são apresentadas no Caso 5, no Capítulo 57.

TABELA 40-7 Algumas doenças ou estados patológicos resultantes ou atribuídos a anormalidades das membranas[1]

Doença	Anormalidade
Acondroplasia (OMIM 100800)	Mutações no gene que codifica o receptor 3 do fator de crescimento de fibroblastos
Hipercolesterolemia familiar (OMIM 143890)	Mutações no gene que codifica o receptor de LDL
Fibrose cística (OMIM 219700)	Mutações no gene que codifica a proteína CFTR, um transportador de Cl^-
Síndrome congênita do QT longo (OMIM 192500)	Mutações nos genes que codificam os canais iônicos do coração
Doença de Wilson (OMIM 277900)	Mutações no gene que codifica uma ATPase dependente de cobre
Doença da célula I (OMIM 252500)	Mutações no gene que codifica a GlcNAc-fosfotransferase, levando à ausência do sinal Man-6-P para a localização lissossomal de determinadas hidrolases
Esferocitose hereditária (OMIM 182900)	Mutações nos genes que codificam a espectrina ou outras proteínas estruturais da membrana eritrocitária
Metástases de células cancerosas	Acredita-se que as anormalidades das cadeias oligossacarídicas das glicoproteínas e dos glicolipídeos das membranas sejam importantes
Hemoglobinúria paroxística noturna (OMIM 311770)	Mutação que resulta em fixação deficiente da âncora de GPI (ver Capítulo 47) a determinadas proteínas da membrana eritrocitária

[1]Os distúrbios relacionados aqui são discutidos de modo mais detalhado em outros capítulos. Esta tabela fornece exemplos de mutações que afetam dois receptores, um transportador, vários canais iônicos (isto é, síndrome congênita do QT longo), duas enzimas e uma proteína estrutural. São também apresentados exemplos de alterações ou anormalidades da glicosilação das glicoproteínas. A maioria dos distúrbios listados afeta a membrana plasmática.

RESUMO

- As membranas são estruturas complexas constituídas de lipídeos, proteínas e moléculas contendo carboidratos.
- A estrutura básica de todas as membranas consiste na bicamada lipídica. Essa bicamada é formada por duas lâminas de fosfolipídeos, nas quais os grupos cabeça polares hidrofílicos estão dirigidos em sentido contrário e ficam expostas ao meio aquoso nas superfícies externa e interna da membrana. As caudas apolares hidrofóbicas dessas moléculas estão orientadas na mesma direção, isto é, para o centro da membrana.
- As membranas são estruturas dinâmicas. Os lipídeos e algumas proteínas sofrem difusão lateral rápida. O *flip-flop* é muito lento para os lipídeos e inexistente para as proteínas.
- O modelo de mosaico fluido proporciona uma base útil para a compreensão da estrutura das membranas.
- As proteínas de membrana são classificadas em proteínas integrais, quando estão firmemente inseridas na bicamada, e em proteínas periféricas, quando estão fixadas à superfície externa ou interna.
- As 20 ou mais membranas existentes em uma célula de mamífero apresentam composições e funções diferentes e definem compartimentos ou ambientes especializados dentro da célula, que desempenham funções específicas (p. ex., lisossomos).
- Algumas moléculas hidrofóbicas difundem-se livremente através das membranas, porém o movimento de outras é limitado pelo seu tamanho ou carga.
- Diversos mecanismos passivos e ativos (habitualmente dependentes de ATP) são empregados para manter os gradientes dessas moléculas por meio de diferentes membranas.
- Determinados solutos, como, por exemplo, a glicose, entram nas células por difusão facilitada, ao longo de um gradiente de concentração, de uma concentração alta para uma concentração baixa, usando proteínas carreadoras (transportadoras) específicas.
- As principais bombas impulsionadas por ATP são classificadas em transportadores P (fosforilados), F (fatores de energia), V (vacuolares) e ABC. Os membros dessas classes incluem a Na^+-K^+-ATPase e a Ca^{2+}-ATPase do retículo sarcoplasmático; a ATP-sintase mt; a ATPase que acidifica os lisossomos; e as proteínas CFTR e MDR-1.
- Os canais iônicos regulados por ligantes ou por voltagem são frequentemente utilizados para a transferência de moléculas de carga elétrica (Na^+, K^+, Ca^{2+} etc.) por meio das membranas, ao longo de seus gradientes eletroquímicos.
- As moléculas grandes podem entrar nas células ou sair delas por mecanismos como a endocitose ou a exocitose. Esses processos frequentemente necessitam da ligação da molécula a um receptor, conferindo especificidade ao processo.
- Os receptores podem ser componentes integrais das membranas (particularmente da membrana plasmática). A interação de um ligante com o seu receptor pode não envolver a transferência de um deles para dentro da célula, porém a interação resulta na geração de um sinal que influencia os processos intracelulares (sinalização transmembrana).
- As mutações que afetam a estrutura das proteínas de membrana (receptores, transportadores, canais iônicos, enzimas e proteínas estruturais) podem causar doenças; entre os exemplos, destacam-se a fibrose cística e a hipercolesterolemia familiar.

REFERÊNCIAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al: *Molecular Biology of the Cell,* 5th ed. Garland Science, 2008.

Cooper GM, Hausman RE: *The Cell, A Molecular Approach*. Sinauer Assoc Inc., 2009.

Doherty GJ, McMahon HT: Mechanisms of endocytosis. Annu Rev Biochem 2009;78:857.

Lodish H, Berk A, Kaiser CA, et al: *Molecular Cell Biology,* 6th ed. WH Freeman & Co, 2008.

Longo N: Inherited defects of membrane transport. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine,* 17th ed. Fauci AS, et al (editors). Chapter 359. McGraw-Hill, 2008.

Pollard TD, Earnshaw WC: *Cell Biology,* 2nd ed. Saunders Elsevier, 2008.

Singer SJ: Some early history of membrane molecular biology. Annu Rev Physiol 2004;66:1.

Vance DE, Vance J (editors): *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes,* 5th ed. Elsevier, 2008.

Voelker DR: Genetic and biochemical analysis of non-vesicular lipid traffic. Annu Rev Biochem 2009;78:827.

CAPÍTULO

41

A Diversidade do Sistema Endócrino

P. Anthony Weil, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Explicar os princípios básicos da ação dos hormônios endócrinos, incluindo os determinantes da resposta das células-alvo dos hormônios e os determinantes da concentração de hormônio nas células-alvo.
- Compreender a ampla diversidade e os mecanismos de ação dos hormônios endócrinos.
- Reconhecer as etapas complexas envolvidas na produção, no transporte e no armazenamento dos hormônios.

ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
ANF	Fator natriurético atrial
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
CBG	Globulina de ligação dos corticosteroides
CG	Gonadotropina coriônica
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
CLIP	Peptídeo do lobo intermediário semelhante à corticotropina
DBH	Dopamina β-hidroxilase
DHEA	Desidroepiandrosterona
DHT	Di-hidrotestosterona
DIT	Di-iodotirosina
DOC	Desoxicorticosterona
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FSH	Hormônio folículo estimulante
GH	Hormônio do crescimento
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina-I
LH	Hormônio luteotrópico
LPH	Lipotropina
MIT	Monoiodotirosina
MSH	Hormônio melanócito estimulante
OHSD	Hidroxiesteroide-desidrogenase
PNMT	Feniletanolamina-*N*-metiltransferase
POMC	Pró-opiomelanocortina
SHBG	Globulina de ligação dos hormônios sexuais
StAR	(Proteína) reguladora aguda da esteroidogênese
TBG	Globulina de ligação da tiroxina
TEBG	Globulina de ligação da testosterona-estrogênio
THR	Hormônio de liberação da tireotropina
TSH	Hormônio de estimulação da tireotropina

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A sobrevida dos organismos multicelulares depende de sua capacidade de adaptação a um ambiente em constante mudança. Para essa adaptação, são necessários mecanismos de comunicação intercelular. O sistema nervoso e o sistema endócrino proporcionam essa ampla comunicação intercelular no organismo. A princípio, o sistema nervoso era considerado como um sistema de comunicação fixo, enquanto o sistema endócrino produzia hormônios, que consistiam em mensagens móveis. De fato, existe uma notável convergência desses sistemas reguladores. Por exemplo, a regulação neural do sistema endócrino é importante na produção e na secreção de alguns hormônios; muitos neurotransmissores assemelham-se a hormônios no que concerne à sua síntese, transporte e mecanismo de ação; e muitos hormônios são sintetizados no sistema nervoso. O termo "hormônio" origina-se do grego e significa despertar para a atividade. De acordo com a sua definição clássica, o hormônio é uma substância sintetizada em um órgão e transportada pelo sistema circulatório para atuar em outro tecido. Entretanto, essa descrição original é muito restritiva, visto que os hormônios podem atuar em células adjacentes (ação parácrina) e na célula onde foram sintetizados (ação autócrina) sem a necessidade de entrar na circulação sistêmica. Uma gama diversificada de hormônios – cada um com mecanismos de ação e propriedades de biossíntese, armazenamento, secreção, transporte e metabolismo distintos – evoluiu para assegurar respostas homeostáticas. Essa diversidade bioquímica constitui o tema deste capítulo.

O CONCEITO DE CÉLULA-ALVO

Existem cerca de 200 tipos de células diferenciadas nos seres humanos. Apenas algumas produzem hormônios, porém praticamente todos os 75 trilhões de células do corpo humano são alvos de um ou mais dos > 50 hormônios conhecidos. O conceito de célula-alvo proporciona uma maneira útil de compreender a ação dos hormônios. No passado, acreditava-se que os hormônios afetavam um único tipo celular – ou apenas alguns tipos de células – e que o hormônio desempenhava uma única ação bioquímica ou fisiológica. Atualmente, sabe-se que determinado hormônio pode afetar vários tipos celulares diferentes, que mais de um hormônio pode atuar em determinado tipo de célula, e que os hormônios podem exercer muitos efeitos diferentes em determinada célula ou em células distintas. Com a descoberta dos receptores de hormônios específicos intracelulares e de superfície celular, a definição de alvo foi ampliada para incluir qualquer célula na qual o hormônio (ligante) liga-se a seu receptor, independentemente da existência comprovada ou não de uma resposta bioquímica ou fisiológica.

Vários fatores determinam a resposta de uma célula-alvo a determinado hormônio e podem ser classificados de duas maneiras gerais: (1) como fatores que afetam a concentração do hormônio na célula-alvo (**Tabela 41-1**) e (2) como fatores que afetam a resposta efetiva da célula-alvo ao hormônio (**Tabela 41-2**).

OS RECEPTORES DE HORMÔNIOS TÊM IMPORTÂNCIA FUNDAMENTAL

Os receptores discriminam com precisão

A **Figura 41-1** ilustra um dos principais desafios enfrentados para que o sistema de comunicação hormonal possa funcionar. Os hormônios estão presentes em concentrações muito baixas no líquido extracelular, geralmente na faixa atomolar a nanomolar (10^{-15} a 10^{-9} mol/L). Essa concentração é muito menor que a das numerosas moléculas estruturalmente semelhantes (esteróis, aminoácidos, peptídeos e proteínas) e outras moléculas que circulam em concentrações na faixa de micro a milimolares (10^{-6} a 10^{-3} mol/L). Por conseguinte, as células-alvo precisam distinguir não apenas entre os diferentes hormônios presentes em pequenas quantidades, como também entre determinado hormônio e as outras moléculas semelhantes em concentrações 10^6 a 10^9 vezes maiores. Esse alto grau de discriminação é assegurado por moléculas de reconhecimento associadas às células, denominadas receptores. Os hormônios iniciam seus efeitos biológicos por meio de sua ligação a receptores específicos e, como qualquer sistema de controle efetivo também deve assegurar uma maneira de interromper determinada resposta, as ações induzidas pelos hormônios geralmente, mas nem sempre, terminam quando o efetor dissocia-se do receptor (Figura 38-1; resposta Tipo A).

TABELA 41-1 Determinantes da concentração de um hormônio na célula-alvo

A taxa de síntese e secreção dos hormônios.
A proximidade da célula-alvo em relação à fonte do hormônio (efeito de diluição).
As constantes de dissociação do hormônio com proteínas transportadoras plasmáticas específicas (se houver).
A conversão de formas inativas ou parcialmente ativas do hormônio na forma totalmente ativa.
A taxa de depuração do plasma por outros tecidos ou por digestão, metabolismo ou excreção.

TABELA 41-2 Determinantes da resposta das células-alvo

A quantidade, a atividade relativa e o estado de ocupação dos receptores específicos na membrana plasmática, no citoplasma ou no núcleo.
O metabolismo (ativação ou inativação) do hormônio na célula-alvo.
A presença de outros fatores no interior da célula que são necessários para a resposta hormonal.
Up ou *down-regulation* do receptor em virtude da interação com seu ligante.
Dessensibilização pós-receptor da célula, incluindo *down-regulation* do receptor.

A célula-alvo é definida pela sua capacidade de ligar seletivamente determinado hormônio a seu receptor correspondente. Para que as interações entre o hormônio e o receptor sejam fisiologicamente relevantes, vários aspectos bioquímicos dessa interação são importantes: (1) a ligação deve ser específica, isto é, passível de ser desfeita por um agonista ou antagonista; (2) a ligação deve ser saturável; e (3) a ligação deve ocorrer dentro da faixa de concentrações da resposta biológica esperada.

Os receptores possuem domínios tanto de reconhecimento quanto de acoplamento

Todos os receptores apresentam pelo menos dois domínios funcionais. O domínio de reconhecimento liga-se ao ligante hor-

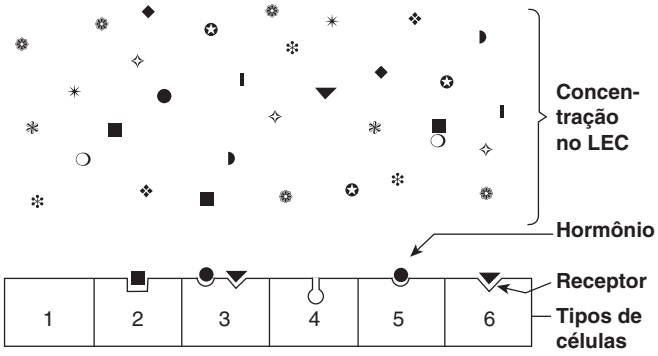


FIGURA 41-1 Especificidade e seletividade dos receptores de hormônios. Numerosas moléculas diferentes circulam no líquido extracelular (LEC), porém apenas algumas delas são reconhecidas pelos receptores de hormônios. Os receptores devem selecionar essas moléculas a partir de altas concentrações das outras moléculas. Essa ilustração simplificada mostra que uma célula pode não ter receptores de hormônios (1), pode apresentar um tipo de receptor (2+5+6), ter receptores de vários hormônios (3), ou um receptor, porém sem hormônio nas proximidades (4).

monal, e uma segunda região gera um sinal que acopla o reconhecimento do hormônio a alguma função intracelular. Esse acoplamento ou transdução de sinal ocorre de duas maneiras gerais. Os hormônios polipeptídicos e proteicos, bem como as catecolaminas, ligam-se a receptores localizados na membrana plasmática e, portanto, geram um sinal que regula várias funções intracelulares frequentemente ao modificar a atividade de uma enzima. Por outro lado, os esteroides, os retinoides e os hormônios tireoidianos interagem com receptores intracelulares, e esse complexo ligante-receptor é que fornece diretamente o sinal, em geral para genes específicos cujas taxas de transcrição são consequentemente afetadas.

Os domínios responsáveis pelo reconhecimento do hormônio e pela geração de sinais foram identificados nos receptores de hormônios polipeptídicos proteicos e das catecolaminas. Os receptores de esteroides, dos hormônios tireoidianos e de retinoides apresentam vários domínios funcionais: um sítio liga-se ao hormônio; outro liga-se a regiões específicas do DNA, um terceiro está envolvido na interação com outras proteínas correguladoras, resultando na ativação (ou na repressão) da transcrição gênica, e, por fim, um quarto sítio pode ligar-se especificamente a uma ou mais proteínas adicionais que influenciam o tráfego do receptor.

A dupla função de ligação e acoplamento define, em última análise, um receptor, sendo o acoplamento da ligação do hormônio à transdução do sinal – o denominado **acoplamento receptor-efetor** – o que assegura a primeira etapa na amplificação da resposta hormonal. Essa dupla função também diferencia o receptor da célula-alvo das proteínas carreadoras plasmáticas que se ligam ao hormônio, mas que não geram sinais (ver Tabela 41-6).

Os receptores são proteínas

Foram definidas várias classes de receptores de hormônios peptídicos. Por exemplo, o receptor da insulina é um heterotetrâmero composto de duas cópias de duas subunidades proteicas diferentes ($\alpha_2\beta_2$) ligadas por múltiplas pontes de dissulfeto, nas quais a subunidade α extracelular ligam-se à insulina, enquanto a subunidade β que atravessa a membrana de um lado ao outro é responsável pela transdução do sinal por meio do domínio de tirosina proteinoquinase localizado na porção citoplasmática desse polipeptídeo. Em geral, os receptores do fator de crescimento I semelhante à insulina (IGF-I) e do fator de crescimento epidérmico (EGF) assemelham-se, na sua estrutura, ao receptor da insulina. Os receptores do hormônio do crescimento e da prolactina também atravessam a membrana plasmática das células-alvo de um lado ao outro, porém não contêm atividade intrínseca de proteinoquinase. Todavia, a ligação do ligante a esses receptores resulta na associação e na ativação de uma via de sinalização de proteinoquinase totalmente diferente, conhecida como via JakStat. Os receptores de hormônios polipeptídicos e das catecolaminas, que transduzem sinais ao alterar a taxa de produção do AMPc pelas proteínas G, caracterizam-se pela presença de sete domínios que atravessam a membrana plasmática de um lado ao outro. A ativação da proteinoquinase e a geração de AMP cíclico (AMPc, ácido 3′5′-adenílico; ver Figura 19-5) constituem uma ação *downstream* dessa classe de receptores (ver Capítulo 42 para mais detalhes).

A comparação de vários receptores diferentes de esteroides com os receptores dos hormônios tireoidianos revelou uma notável conservação da sequência de aminoácidos em determinadas regiões, particularmente nos domínios de ligação do DNA. Isso levou ao reconhecimento de que os receptores dos esteroides ou dos hormônios tireoidianos são membros de uma grande superfamília de receptores nucleares. Na atualidade, muitos membros relacionados dessa família não possuem ligantes conhecidos e, por esse motivo, são denominados receptores órfãos. A superfamília dos receptores nucleares desempenha um papel crítico na regulação da transcrição gênica pelos hormônios, conforme descrito no Capítulo 42.

OS HORMÔNIOS PODEM SER CLASSIFICADOS DE DIVERSAS MANEIRAS

Os hormônios podem ser classificados de acordo com a composição química, as propriedades de solubilidade, a localização dos receptores e a natureza do sinal utilizado para mediar a ação hormonal dentro da célula. A **Tabela 41-3** fornece uma classificação baseada nessas últimas duas propriedades, enquanto a **Tabela 41-4** descreve as características gerais de cada grupo.

Os hormônios do grupo I são lipofílicos. Após a sua secreção, esses hormônios associam-se a proteínas plasmáticas transportadoras ou carreadoras, em um processo que evita o problema da solubilidade e, ao mesmo tempo, prolonga a meia-vida plasmática do hormônio. As porcentagens relativas do hormônio ligado e do hormônio livre são determinadas pela quantidade, pela afinidade de ligação e pela capacidade de ligação da proteína de transporte. O hormônio livre, que constitui a forma biologicamente ativa, atravessa prontamente a membrana plasmática lipofílica de todas as células e alcança os receptores situados no citosol ou no núcleo das células-alvo. Acredita-se que o complexo ligante-receptor seja o mensageiro intracelular nesse grupo.

O segundo grupo principal consiste nos hormônios hidrossolúveis, os quais se ligam a receptores específicos que atravessam de um lado ao outro a membrana plasmática da célula-alvo. Os hormônios que se ligam a esses receptores de superfície das células comunicam-se com os processos metabólicos intracelulares por meio de moléculas intermediárias, denominadas **mensageiros secundários** (o próprio hormônio é o mensageiro primário), que são gerados em consequência da interação entre o ligante e o receptor. O conceito de mensageiro secundário originou-se da observação de que a epinefrina liga-se à membrana plasmática de determinadas células e aumenta o AMPc intracelular. Em seguida, foram realizados diversos experimentos, nos quais foi constatado que o AMPc medeia os efeitos de muitos hormônios. Os hormônios que empregam esse mecanismo são classificados no grupo II.A da Tabela 41-3. O fator natriurético atrial (ANF) utiliza o GMPc como mensageiro secundário (grupo II.B). Vários hormônios, muitos dos quais se acreditava anteriormente que tivessem uma influência sobre o AMPc, parecem utilizar o cálcio iônico (Ca^{2+}) ou os metabólitos de fosfoinositídeos complexos (ou ambos) como sinal intracelular do mensageiro secundário. Esses hormônios estão incluídos no grupo II.C da tabela. O mensageiro intracelular para o grupo II.D consiste em cascatas de proteinoquinases-fosfatases; várias delas foram identificadas, e determinado hormônio pode

TABELA 41-3 Classificação dos hormônios de acordo com o mecanismo de ação

I. Hormônios que se ligam a receptores intracelulares
Androgênios
Calcitriol (1,25[OH]$_2$-D$_3$)
Estrogênios
Glicocorticoides
Mineralocorticoides
Progestinas
Ácido retinoico
Hormônios tireoidianos (T_3 e T_4)
II. Hormônios que se ligam a receptores de superfície celular
A. O mensageiro secundário é AMPc
Catecolaminas α_2-adrenérgicas
Catecolaminas β-adrenérgicas
Hormônio adrenocorticotrópico (ACTH)
Hormônio antidiurético
Calcitonina
Gonadotropina coriônica, humana (CG)
Hormônio de liberação da corticotropina
Hormônio folículo estimulante (FSH)
Glucagon
Lipotropina (LPH)
Hormônio luteinizante (LH)
Hormônio melanócito estimulante (MSH)
Paratormônio (PTH)
Somatostatina
Hormônio tireoestimulante (TSH)
B. O mensageiro secundário é GMPc
Fator natriurético atrial
Ácido nítrico
C. O mensageiro secundário é cálcio ou fosfatidilinositol (ou ambos)
Acetilcolina (muscarínicos)
Catecolaminas α_1-adrenérgicas
Angiotensina II
Hormônio antidiurético (vasopressina)
Colecistocinina
Gastrina
Hormônio de liberação das gonadotropinas
Ocitocina
Fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF)
Substância P
Hormônio de liberação da tireotropina
D. O mensageiro secundário é uma cascata de quinases ou fosfatases
Adiponectina
Somatomamotropina coriônica
Fator de crescimento epidérmico (EGF)
Eritropoietina (EPO)
Fator de crescimento dos fibroblastos (FGF)
Hormônio do crescimento (GH)
Insulina
Fatores de crescimento semelhantes às insulinas I e II
Leptina
Fator de crescimento neural (NGF)
Fator de crescimento derivado das plaquetas
Prolactina

TABELA 41-4 Características gerais das classes de hormônios

	Grupo I	Grupo II
Tipos	Esteroides, iodotironinas, calcitriol, retinoides	Polipeptídeos, proteínas, glicoproteínas, catecolaminas
Solubilidade	Lipofílicos	Hidrofílicos
Proteínas transportadoras	Sim	Não
Meia-vida plasmática	Longa (horas a dias)	Curta (minutos)
Receptor	Intracelular	Membrana plasmática
Mediador	Complexo receptor-hormônio	AMPc, GMPc, Ca^{2+}, metabólitos de fosfinositois complexos, cascatas de quinases

utilizar mais de uma cascata de quinase. Alguns hormônios são classificados em mais de uma categoria, e as atribuições irão mudar à medida que forem obtidas novas informações.

DIVERSIDADE DO SISTEMA ENDÓCRINO

Os hormônios são sintetizados em uma variedade de arranjos celulares

Os hormônios são sintetizados em órgãos distintos, desenvolvidos exclusivamente para esse propósito específico, como a glândula tireoide (tri-iodotironina), as suprarrenais (glicocorticoides e mineralocorticoides) e a hipófise (TSH, FSH, LH, hormônio do crescimento, prolactina e ACTH). Alguns órgãos estão destinados a desempenhar duas funções distintas, porém estreitamente relacionadas. Por exemplo, os ovários produzem ovócitos maduros, bem como os hormônios reprodutores, o estradiol e a progesterona. Os testículos produzem espermatozoides maduros e sintetizam a testosterona. Os hormônios também são produzidos em células especializadas dentro de outros órgãos, como o intestino delgado (peptídeo semelhante ao glucagon), a glândula tireoide (calcitonina) e os rins (angiotensina II). Por fim, a síntese de alguns hormônios depende das células parenquimatosas de mais de um órgão – p. ex., a pele, o fígado e o rim são necessários para a produção de 1,25(OH)$_2$-D$_3$ (calcitriol). A seguir, são discutidos alguns exemplos dessa diversidade nos processos de síntese hormonal, tendo cada um deles evoluído para cumprir um propósito específico.

Os hormônios são quimicamente distintos

Os hormônios são sintetizados a partir de uma ampla variedade de blocos químicos de construção. Muitos desses hormônios originam-se do colesterol, como os glicocorticoides, os mineralocorticoides, os estrogênios, as progestinas e o 1,25(OH)$_2$-D$_3$ (**Figura 41-2**). Em alguns casos, um hormônio esteroide atua

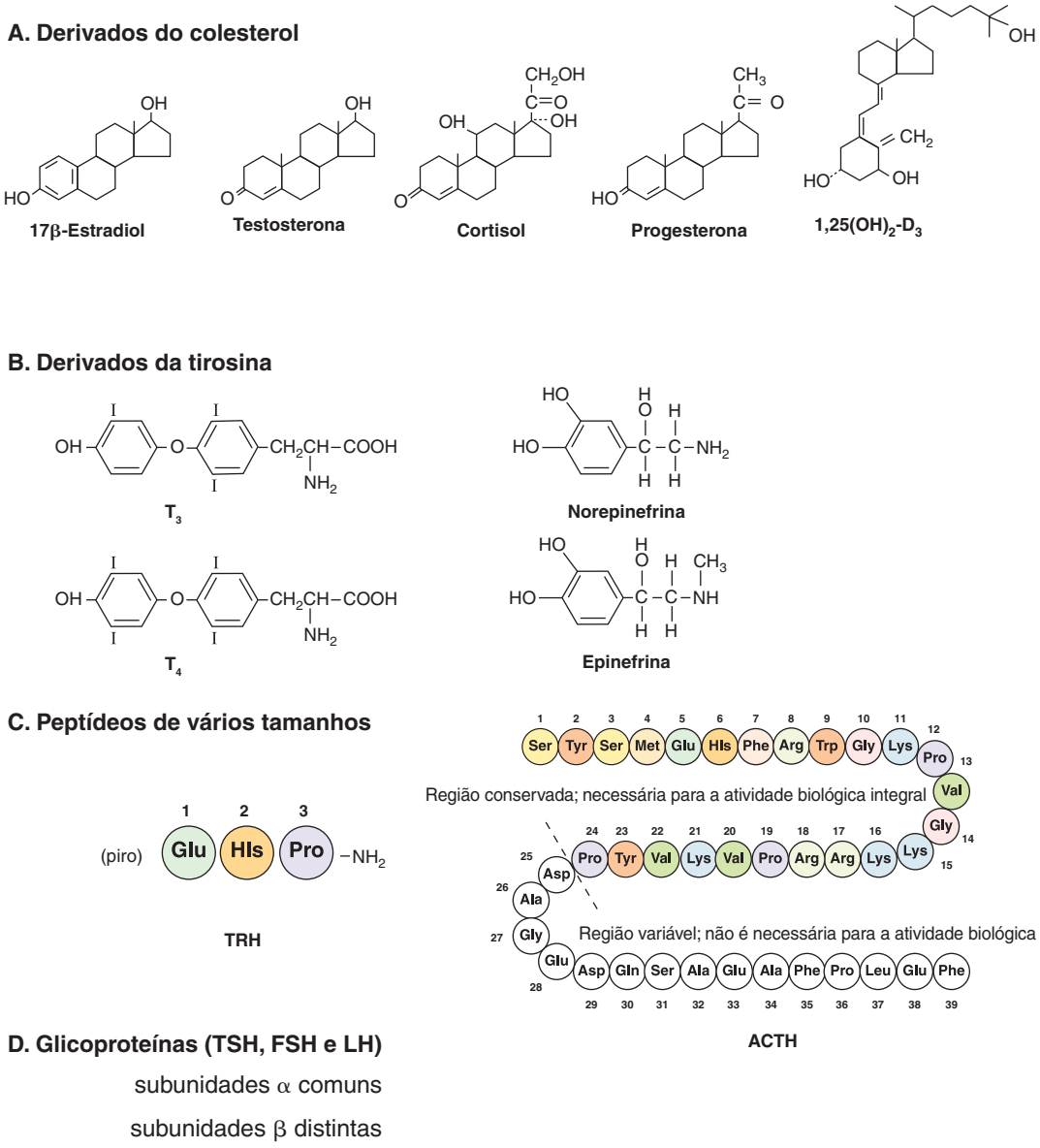


FIGURA 41-2 Diversidade química dos hormônios: (A) derivados do colesterol: (B) derivados da tirosina; (C) peptídeos de vários tamanhos; (D) glicoproteínas (TSH, FSH e LH) com subunidades α e β distintas.

como molécula precursora para outro hormônio. Por exemplo, a progesterona é um hormônio propriamente dito, mas também atua como precursor na síntese dos glicocorticoides, dos mineralocorticoides, da testosterona e dos estrogênios. A testosterona é um intermediário obrigatório na biossíntese do estradiol e na formação da di-hidrotestosterona (DHT). Nesses exemplos, descritos detalhadamente adiante, o produto final é determinado pelo tipo celular e pelo conjunto associado de enzimas nos quais se encontra o precursor.

O aminoácido tirosina é o ponto de partida na síntese das catecolaminas e dos hormônios tireoidianos tetraiodotironina (tiroxina; T_4) e tri-iodotironina (T_3) (Figura 41-2). A T_3 e a T_4 são hormônios singulares, visto que necessitam da adição de iodo (na forma de I^-) para a sua bioatividade. Como o iodo da dieta é muito escasso em muitas regiões do mundo, o organismo desenvolveu um mecanismo complexo para o acúmulo e a conservação do I^-.

Numerosos hormônios são polipeptídeos ou glicoproteínas. As dimensões desses hormônios variam desde um tripeptídeo, como o hormônio de liberação da tireotropina (TRH) até polipeptídeos de cadeias simples, como o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH; 39 aminoácidos), o paratormônio (PTH; 84 aminoácidos) e o hormônio do crescimento (GH; 191 aminoácidos) (Figura 41-2). A insulina é um heterodímero de cadeias AB de 21 e 30 aminoácidos, respectivamente. O hormônio folículo estimulante (FSH), o hormônio luteinizante (LH), o hormônio estimulante da tireoide (TSH) e a gonadotropina coriônica (CG) são hormônios glicoproteicos com estrutura heterodimérica αβ. A cadeia α é idêntica em todos esses hormônios, e as cadeias β distintas conferem aos hormônios a sua singularidade. Esses hor-

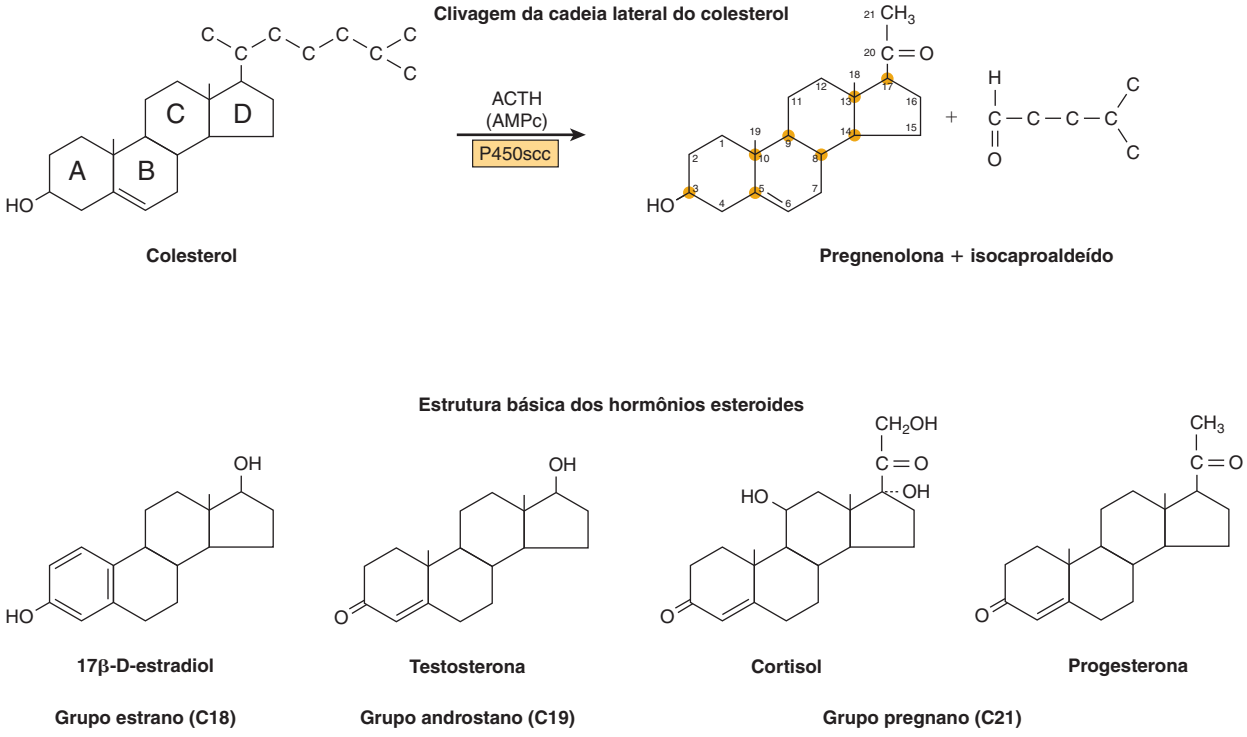


FIGURA 41-3 Clivagem da cadeia lateral do colesterol e estruturas básicas dos hormônios esteroides. Os anéis esterois básicos são identificados pelas letras A a D. Os átomos de carbono são numerados de 1 a 21, começando pelo anel A.

mônios apresentam massa folicular na faixa de 25 a 30 kDa, dependendo do grau de glicosilação e do comprimento da cadeia β.

Os hormônios são sintetizados e modificados de várias maneiras para exercer a sua atividade integral

Alguns hormônios são sintetizados em sua forma final e secretados imediatamente. Nessa classe estão incluídos os hormônios que se originam do colesterol. Outros, como as catecolaminas, são sintetizados em suas formas finais e armazenados nas células que os produzem, enquanto alguns, ainda, como a insulina, são sintetizados a partir de moléculas precursoras nas células produtoras e, em seguida, são processados e secretados na presença de um estímulo fisiológico (concentrações plasmáticas de glicose). Por fim, outros hormônios são convertidos nas formas ativas a partir de moléculas precursoras na periferia (T_3 e DHT). Todos esses exemplos são discutidos de modo mais detalhado, adiante.

MUITOS HORMÔNIOS SÃO SINTETIZADOS A PARTIR DO COLESTEROL

Esteroidogênese suprarrenal

Os hormônios esteroides suprarrenais são sintetizados a partir do colesterol, que provém em sua maior parte do plasma, enquanto uma pequena parcela é sintetizada *in situ* a partir da acetil-CoA por meio do mevalonato e do esqualeno. O colesterol presente nas suprarrenais é, em grande parte, esterificado e armazenado nas gotículas lipídicas do citoplasma. Com a estimulação da suprarrenal pelo ACTH, ocorre ativação de uma esterase, e o colesterol livre formado é transportado para dentro da mitocôndria, onde uma **enzima de clivagem da cadeia lateral do citocromo P450** (**P450scc**) converte o colesterol em pregnenolona. A clivagem da cadeia lateral envolve hidroxilações sequenciais, em primeiro lugar no C_{22} e então no C_{20}, seguidas da clivagem da cadeia lateral (remoção do isocaproaldeído, um fragmento de seis carbonos) para produzir o esteroide de 21 carbonos (**Figura 41-3**, parte superior). Uma **proteína reguladora aguda da esteroidogênese** (**StAR**) dependente de ACTH é essencial para o transporte do colesterol até a P450scc na membrana mitocondrial interna.

Todos os hormônios esteroides dos mamíferos são formados a partir do colesterol pela pregnenolona, por meio de uma série de reações que ocorrem nas mitocôndrias ou no retículo endoplasmático da célula reprodutora. As hidroxilases que necessitam de oxigênio molecular e NADPH são essenciais, porém as desidrogenases, uma isomerase e uma liase também são necessárias em determinadas etapas. Existe especificidade celular na esteroidogênese suprarrenal. Por exemplo, a 18-hidroxilase e a 19-hidroxiesteroide-desidrogenase, necessárias para a síntese de aldosterona, são encontradas apenas nas células da zona glomerulosa (a região mais externa do córtex suprarrenal), de modo que a biossíntese desse mineralocorticoide limita-se a essa região. A **Figura 41-4** fornece uma representação esquemática das vias envolvidas na síntese das três principais classes de esteroides suprarrenais. As enzimas são mostradas nos retângulos, e as modificações em cada etapa estão sombreadas.

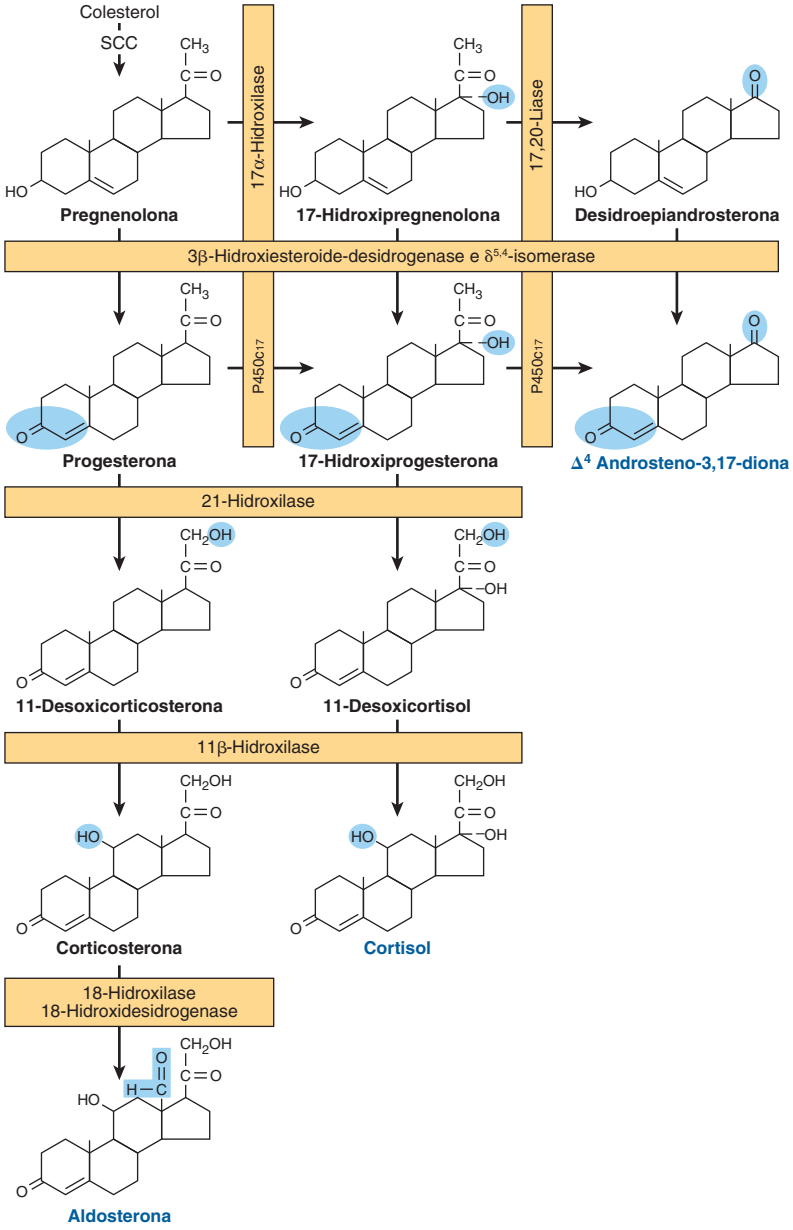


FIGURA 41-4 Vias envolvidas na síntese das três principais classes de esteroides suprarrenais (mineralocorticoides, glicocorticoides e androgênios). As enzimas são apresentadas nos retângulos, enquanto as modificações em cada etapa estão sombreadas. Observe que as atividades da 17α-hidroxilase e da 17,20-liase fazem parte de uma enzima, designada como P450c17. (Ligeiramente modificada e reproduzida, com autorização, de Harding BW: In: *Endocrinology*, vol 2. DeGroot LJ (editors). Grune & Stratton, 1979. Copyright © 1979 Elsevier Inc. Reimpressa com autorização da Elsevier.)

Síntese dos mineralocorticoides

A síntese da aldosterona segue a via dos mineralocorticoides e ocorre na zona glomerulosa. A pregnenolona é convertida em progesterona pela ação de duas enzimas do retículo endoplasmático liso, a **3β-hidroxiesteroide-desidrogenase** (**3β-OHSD**) e a **$\Delta^{5,4}$-isomerase**. A progesterona é hidroxilada na posição C_{21} para formar a 11-desoxicorticosterona (DOC), um mineralocorticoide ativo (na retenção de Na^+). A hidroxilação seguinte, que ocorre em C_{11}, produz a corticosterona, que possui atividade de glicocorticoide e é um mineralocorticoide fraco (apresenta < 5% da potência da progesterona). Em algumas espécies (p. ex., roedores), trata-se do glicocorticoide mais potente. A hidroxilação do C_{21} é necessária para a atividade tanto mineralocorticoide quanto glicocorticoide, porém a maioria dos esteroides com um grupo hidroxila em C_{17} exibe mais ação glicocorticoide e menos atividade mineralocorticoide. Na zona glomerulosa, que não apresenta a enzima 17α-hidroxilase do retículo endoplasmático liso, existe uma 18-hidroxilase mitocondrial. A **18-hidroxilase** (**aldosterona-sintase**) atua sobre a corticosterona para formar a 18-hidroxicorticosterona, que é transformada em aldosterona por conversão da 18-álcool em um aldeído. Essa distribuição singular das enzimas e a regulação especial da zona glomerulosa pelo K^+ e pela angiotensina II levaram alguns pesquisadores a sugerir que, além da suprarrenal consistir em duas glândulas, o córtex suprarrenal representa, na verdade, dois órgãos separados.

Síntese dos glicocorticoides

A síntese do cortisol requer três hidroxilases localizadas nas zonas fasciculada e reticulada do córtex suprarrenal, que atuam de modo sequencial nas posições C_{17}, C_{21} e C_{11}. As primeiras duas reações são rápidas, enquanto a hidroxilação do C_{11} é relativamente lenta. Se a posição C_{11} for hidroxilada em primeiro lugar, a ação da **17α-**

-hidroxilase é impedida, e as reações seguem a via dos mineralocorticoides (com formação de corticosterona ou de aldosterona, dependendo do tipo de célula). A 17α-hidroxilase é uma enzima do retículo endoplasmático liso que atua sobre a progesterona, ou, mais comumente, sobre a pregnenolona. A 17α-hidroxiprogesterona é hidroxilada no C_{21} para formar o 11-desoxicortisol, que, em seguida, é hidroxilado no C_{11} para produzir o cortisol, que é o hormônio glicocorticoide natural mais potente nos seres humanos. A 21-hidroxilase é uma enzima do retículo endoplasmático liso, enquanto a 11β-hidroxilase é uma enzima mitocondrial. Portanto, a esteroidogênese envolve o movimento bidirecional de substratos para dentro e para fora das mitocôndrias.

Síntese dos androgênios

O principal androgênio, ou precursor androgênico, produzido pelo córtex suprarrenal é a **desidroepiandrosterona** (DHEA). A maior parte da 17-hidroxipregnenolona segue a via dos glicocorticoides, porém uma pequena fração sofre cisão oxidativa, com remoção da cadeia lateral de dois carbonos pela ação da 17, 20-liase. Na verdade, a atividade de liase faz parte da mesma enzima (P450c17) que catalisa a 17α-hidroxilação. Assim, trata-se de uma **proteína de função dupla**. A atividade de liase é importante tanto nas suprarrenais quanto nas gônadas e atua exclusivamente nas moléculas que contêm 17α-hidroxi. A produção de androgênios suprarrenais aumenta acentuadamente se a biossíntese de glicocorticoides for impedida pela ausência de uma das hidroxilases (**síndrome adrenogenital**). A DHEA, na realidade, é um pró-hormônio, visto que as ações da 3β-OHSD e da $\Delta^{5,4}$-isomerase convertem o androgênio fraco DHEA em **androstenediona**, que é mais potente. Pequenas quantidades de androstenediona também são produzidas nas suprarrenais pela ação da liase sobre a 17α-hidroxiprogesterona. A redução da androstenediona na posição C17 leva à formação da **testosterona**, o androgênio suprarrenal mais potente. Pequenas quantidades de testosterona são produzidas nas suprarrenais por esse mecanismo, porém a maior parte dessa convenção ocorre nos testículos.

Esteroidogênese testicular

Os androgênios testiculares são sintetizados no tecido intersticial das células de Leydig. O precursor imediato dos esteroides gonadais é, à semelhança dos esteroides suprarrenais, o colesterol. Conforme observado também nas suprarrenais, a etapa limitadora da taxa de síntese consiste no transporte do colesterol até a membrana interna das mitocôndrias pela proteína transportadora StAR. Quando se encontra no local apropriado, o colesterol é submetido à ação da enzima de clivagem da cadeia lateral, P450scc. A conversão do colesterol em pregnenolona é idêntica nas suprarrenais, nos ovários e nos testículos. Entretanto, nestes dois últimos tecidos, a reação é promovida pelo LH, e não pelo ACTH.

A conversão da pregnenolona em testosterona exige a ação de cinco atividades enzimáticas contidas em três proteínas: (1) 3β-hidroxiesteroide desidrogenase (3β-OHSD) e a $\Delta^{5,4}$-isomerase; (2) a 17α-hidroxilase e a 17,20-liase; e (3) a 17β-hidroxiesteroide desidrogenase (17β-OHSD). Essa sequência, conhecida como via da **progesterona** (**ou Δ^4**), está ilustrada no lado direito da **Figura 41-5**. A pregnenolona também pode ser convertida em testosterona pela via da **desidroepiandrosterona** (**ou Δ^5**), que está ilustrada no lado esquerdo da Figura 41-5. A via Δ^5 parece ser mais utilizada nos testículos humanos.

As cinco atividades enzimáticas estão localizadas na fração microssomal nos testículos de ratos, e existe uma estreita associação funcional entre as atividades da 3β-OHSD e da $\Delta^{5,4}$-isomerase e entre as da 17α-hidroxilase e da 17,20-liase. A Figura 41-5 mostra na sequência geral da reação esses pares enzimáticos, ambos contidos em uma única proteína.

A DHT é sintetizada a partir da testosterona nos tecidos periféricos

A testosterona é metabolizada por duas vias. Uma delas envolve a oxidação na posição 17, enquanto a outra envolve a redução da dupla redução do anel A e da 3-cetona. O metabolismo pela primeira via ocorre em muitos tecidos, incluindo o fígado, e produz 17-cetoesteroides, que geralmente são inativos ou menos ativos do que o composto original. O metabolismo pela segunda via, que é menos eficiente, ocorre principalmente nos tecidos-alvos e produz o potente metabólito DHT.

O produto metabólico mais significativo da testosterona é a DHT, visto que, em muitos tecidos, incluindo a próstata, a genitália externa e algumas áreas da pele, ela é a forma ativa do hormônio. No homem adulto, a concentração plasmática de DHT é cerca de um décimo da concentração da testosterona, e, diariamente, são produzidos ~ 400 μg de DHT, em comparação com cerca de 5 mg de testosterona. Cerca de 50 a 100 μg de DHT são secretados pelos testículos. O restante é produzido perifericamente a partir da testosterona, em uma reação catalisada pela **5α-redutase** dependente de NADPH (**Figura 41-6**). Deste modo, a testosterona pode ser considerada como um pró-hormônio, visto que é convertida em um composto muito mais potente (DHT) e que a maior parte dessa conversão ocorre fora dos testículos. Parte do estradiol é formada a partir da aromatização periférica da testosterona, particularmente nos homens.

Esteroidogênese ovariana

Os estrogênios constituem uma família de hormônios sintetizados em uma variedade de tecidos. O 17β-Estradiol é o principal estrogênio de origem ovariana. Em algumas espécies, a estrona, sintetizada em numerosos tecidos, é mais abundante. Na gravidez, ocorre produção de uma quantidade relativamente maior de estriol, proveniente da placenta. A via geral e a localização subcelular das enzimas envolvidas nas etapas iniciais da síntese do estradiol são as mesmas que aquelas envolvidas na biossíntese dos androgênios. A **Figura 41-7** ilustra as características próprias dos ovários.

Os estrogênios são formados pela aromatização dos androgênios, em um processo complexo que envolve três etapas de hidroxilação, exigindo, cada uma delas, a presença de O_2 e de NADPH. Acredita-se que o **complexo enzimático da aromatase** inclua uma monoxigenase P450. O estradiol é formado se o substrato desse complexo enzimático for a testosterona, enquanto a estrona resulta na aromatização da androstenediona.

Tem sido difícil desvendar a fonte celular dos vários esteroides ovarianos, porém a transferência de substratos entre dois tipos de células está envolvida. As células da teca constituem a fonte de androstenediona e de testosterona. Ambas são convertidas pela enzima aromatase nas células da granulosa em estrona e

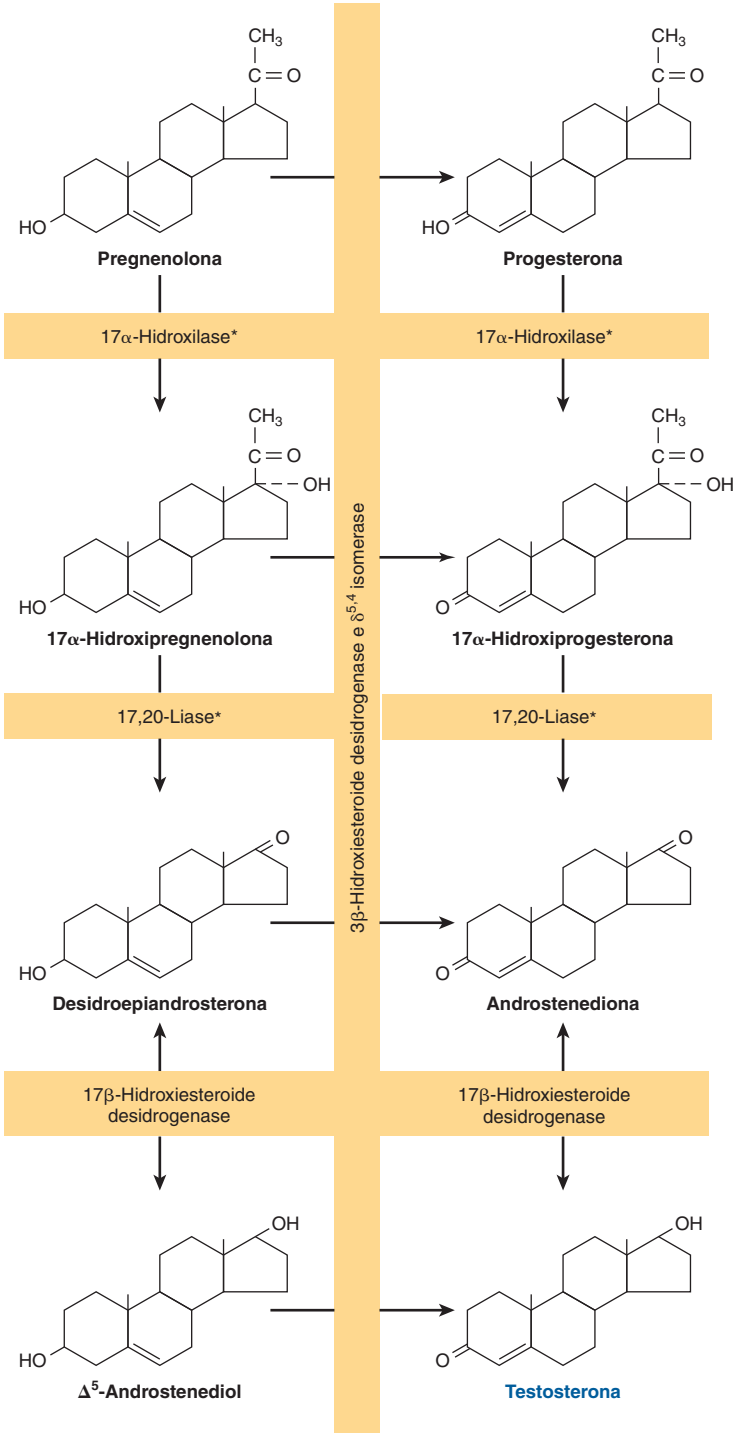


FIGURA 41-5 Vias de biossíntese da testosterona. A via no lado esquerdo da figura é denominada via Δ^5 ou da desidroepiandrosterona; a via no lado direito é denominada via Δ^4 ou da progesterona. O asterisco indica que as atividades da 17α-hidroxilase e da 17,20-liase residem em uma única proteína, a P450c17.

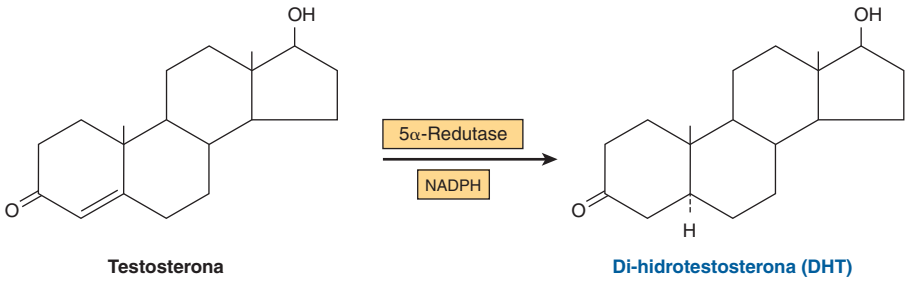


FIGURA 41-6 A di-hidrotestosterona é formada a partir da testosterona pela ação da enzima 5α-redutase.

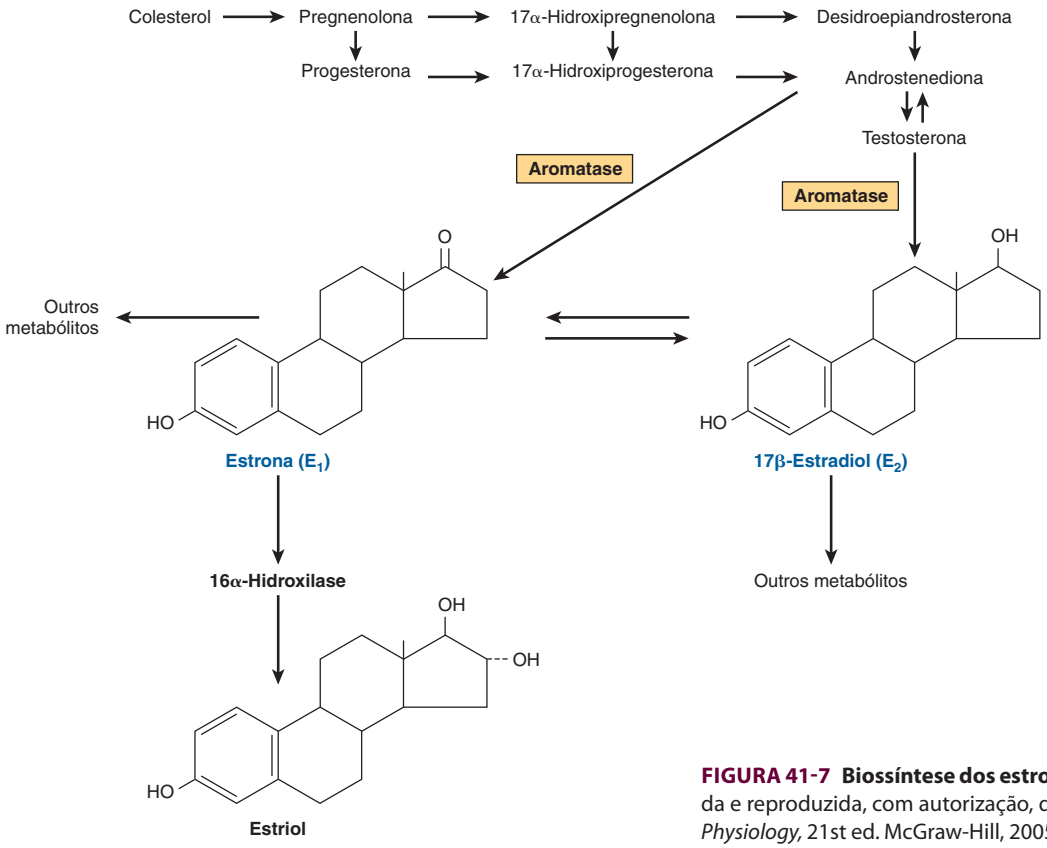


FIGURA 41-7 Biossíntese dos estrogênios. (Ligeiramente modificada e reproduzida, com autorização, de Ganong WF: *Review of Medical Physiology,* 21st ed. McGraw-Hill, 2005.)

estradiol, respectivamente. A progesterona, um precursor de todos os hormônios esteroides, é sintetizada e secretada pelo corpo lúteo como produto final hormonal, visto que essas células não contêm as enzimas necessárias para converter a progesterona em outros hormônios esteroides (**Figura 41-8**).

A aromatização periférica dos androgênios produz quantidades significativas de estrogênio. Nos homens, a aromatização periférica da testosterona em estradiol (E_2) responde por 80% da produção deste último hormônio. Nas mulheres, os androgênios suprarrenais são substratos importantes, visto que até 50% do E_2 formado durante a gravidez provêm da aromatização dos androgênios. Por fim, a conversão da androstenediona em estrona constitui a principal fonte de estrogênios nas mulheres pós-menopausa. A atividade da aromatase está presente nas células adiposas, bem como no fígado, na pele e em outros tecidos. A atividade aumentada dessa enzima pode contribuir para a "estrogenização", que caracteriza certas doenças como a cirrose hepática, o hipertireoidismo, o envelhecimento e a obesidade. Os inibidores da aromatase constituem agentes terapêuticos promissores no câncer de mama e, possivelmente, em outras neoplasias malignas do aparelho reprodutor feminino.

A 1,25(OH)$_2$-D$_3$ (calcitriol) é sintetizada a partir de um derivado do colesterol

A 1,25(OH)$_2$-D$_3$ é sintetizada por uma série complexa de reações enzimáticas que envolvem o transporte plasmático de moléculas precursoras a vários tecidos diferentes (**Figura 41-9**). Um desses precursores é a vitamina D – na realidade, não se trata de uma vitamina, porém esse termo comum persiste. A molécula ativa, a 1,25(OH)$_2$-D$_3$, é transportada para outros órgãos, onde ativa processos biológicos de modo semelhante àqueles utilizados pelos hormônios esteroides.

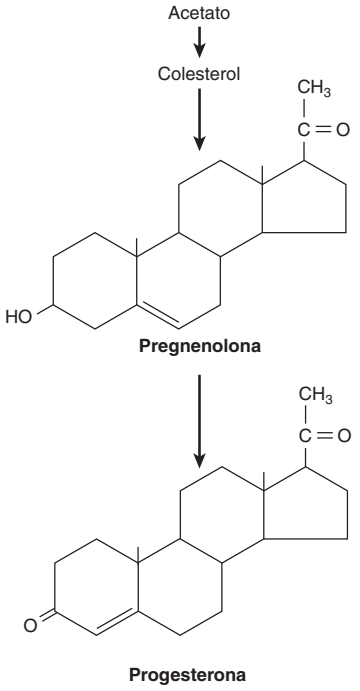


FIGURA 41-8 Biossíntese da progesterona no corpo lúteo.

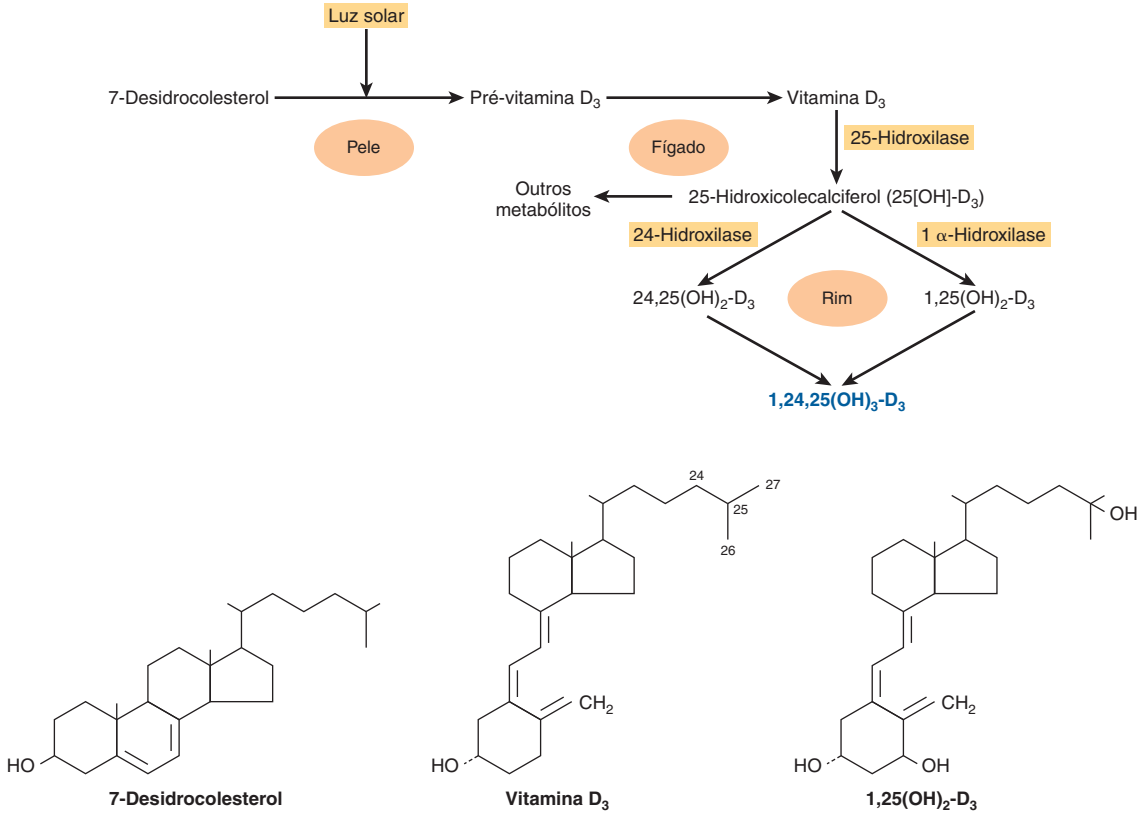


FIGURA 41-9 Formação e hidroxilação da vitamina D_3. A 25-hidroxilação ocorre no fígado, enquanto as outras hidroxilações ocorrem nos rins. É provável que também haja formação de $25,26(OH)_2$-D_3 e de $1,25,26(OH)_3$-D_3. A figura mostra as estruturas do 7-desidrocolesterol, da vitamina D_3 e da $1,25(OH)_2$-D_3. (Modificada e reproduzida, com autorização, de Ganong WF: *Review of Medical Physiology,* 21st ed. McGraw-Hill, 2005.)

Pele

Pequenas quantidades do precursor para a síntese da $1,25(OH)_2$-D_3 estão presentes nos alimentos (óleo de fígado de peixe e gema do ovo), porém a maior parte desse precursor é produzida no estrato de Malpighi da epiderme a partir do 7-desidrocolesterol, em uma reação de **fotólise** não enzimática mediada pela luz ultravioleta. A amplitude dessa conversão está diretamente relacionada com a intensidade da exposição e inversamente relacionada com o grau de pigmentação da pele. Devido ao envelhecimento, ocorre uma redução do 7-desidrocolesterol na epiderme, que pode estar relacionada com o equilíbrio negativo de cálcio associado à idade avançada.

Fígado

Uma proteína de transporte específica, denominada **proteína de ligação da vitamina D**, liga-se à vitamina D_3 e a seus metabólitos, transferindo a vitamina D_3 da pele ou do intestino para o fígado, onde sofre 25-hidroxilação, a primeira reação obrigatória na síntese da $1,25(OH)_2$-D_3. A 25-hidroxilação ocorre no retículo endoplasmático, em uma reação que requer a presença de magnésio, NADPH, oxigênio molecular e de um fator citoplasmático que ainda não foi caracterizado. Duas enzimas estão envolvidas: um citocromo P450 redutase dependente de NADPH e um citocromo P450. Essa reação não é regulada e também ocorre com baixa eficiência nos rins e no intestino. A $25(OH)_2$-D_3 entra na circulação, onde constitui a principal forma da vitamina D encontrada no plasma, e é então transportada aos rins pela proteína de ligação da vitamina D.

Rins

A $25(OH)_2$-D_3 é um agonista fraco, que precisa ser modificada por hidroxilação na posição C_1 para exercer a sua atividade biológica integral. Essa reação ocorre nas mitocôndrias dos túbulos contornados proximais dos rins por uma reação de monoxigenase de três componentes, que exige a presença de NADPH, de Mg^{2+}, de oxigênio molecular e de pelo menos três enzimas: (1) uma flavoproteína, a ferredoxina redutase renal; (2) uma proteína de ferro e enxofre, a ferredoxina renal: e (3) o citocromo P450. Esse sistema produz a $1,25(OH)_2$-D_3, que constitui o metabólito de ocorrência natural mais potente da vitamina D.

AS CATECOLAMINAS E OS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS SÃO FORMADOS A PARTIR DA TIROSINA

As catecolaminas são sintetizadas em sua forma final e armazenadas em grânulos de secreção

Três aminas – dopamina, norepinefrina e epinefrina – são sintetizadas a partir da tirosina nas células cromafins da medula suprar-

renal. A epinefrina é o principal produto da medula suprarrenal, e representa cerca de 80% das catecolaminas da medula suprarrenal e não é sintetizada nos tecidos extramedulares. Em contrapartida, a maior parte da norepinefrina encontrada em órgãos inervados pelos nervos simpáticos é sintetizada *in situ* (cerca de 80% do total), e a maior parte do restante é produzida em outras terminações nervosas, alcançando os locais de ação pela circulação. A epinefrina e a norepinefrina podem ser sintetizadas e armazenadas em diferentes células da medula suprarrenal e de outros tecidos cromafins.

A conversão da tirosina em epinefrina ocorre em quatro etapas sequenciais: (1) hidroxilação do anel; (2) descarboxilação; (3) hidroxilação da cadeia lateral para formar norepinefrina; e (4) *N*-metilação para gerar epinefrina. A **Figura 41-10** ilustra a via da biossíntese e as enzimas envolvidas.

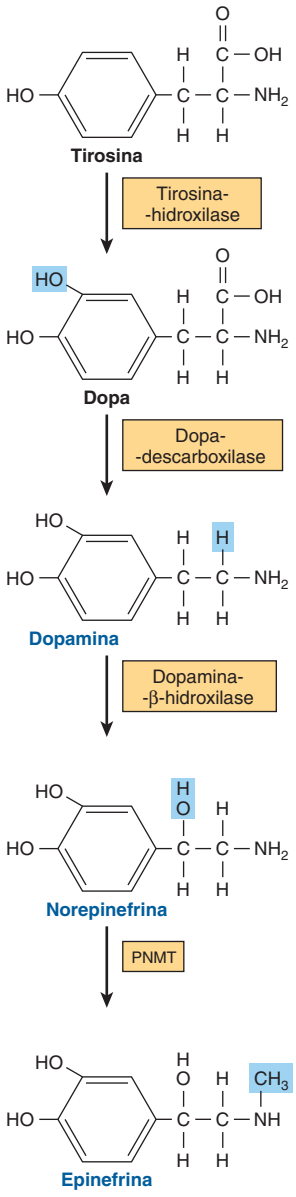


FIGURA 41-10 Biossíntese das catecolaminas. (PNMT, feniletanolamina-*N*-metiltransferase.)

A tirosina-hidroxilase constitui a etapa limitadora de velocidade na biossíntese das catecolaminas

A **tirosina** é o precursor imediato das catecolaminas, e a **tirosina-hidroxilase** é a enzima limitadora de velocidade na biossíntese das catecolaminas. A tirosina-hidroxilase é encontrada nas formas tanto solúvel quanto ligada a partículas somente nos tecidos que sintetizam as catecolaminas. Essa enzima funciona como oxidor-redutase, com tetra-hidropteridina como cofator, para converter a L-tirosina em L-di-hidroxifenilalanina (**L-dopa**). Por ser a enzima que limita a velocidade de síntese, a tirosina-hidroxilase é regulada por uma variedade de mecanismos. O mecanismo mais importante envolve a inibição por retroalimentação das catecolaminas, que competem com a enzima pelo cofator de pteridina. As catecolaminas não podem atravessar a barreira hematoencefálica; por conseguinte, elas precisam ser sintetizadas localmente no cérebro. Em determinadas doenças do sistema nervoso central (p. ex., doença de Parkinson), ocorre deficiência local da síntese de dopamina. A L-Dopa, o precursor da dopamina, atravessa prontamente a barreira hematoencefálica e, assim, constitui um importante agente no tratamento da doença de Parkinson.

A dopa descarboxilase está presente em todos os tecidos

Essa enzima solúvel requer a presença de piridoxal fosfato para a conversão da L-dopa em 3,4-di-hidroxifeniletilamina (**dopamina**). Os compostos que se assemelham à L-dopa, como a α-metildopa, são inibidores competitivos dessa reação. A α-metildopa mostra-se efetiva no tratamento de alguns tipos de hipertensão.

A dopamina-β-hidroxilase (DBH) catalisa a conversão de dopamina em norepinefrina

A DBH é uma monoxigenase que utiliza o ascorbato como doador de elétrons, o cobre no sítio ativo e o fumarato como modulador. A DBH encontra-se na fração particulada das células medulares, provavelmente nos grânulos secretores; desta maneira, a conversão da dopamina em **norepinefrina** ocorre nessa organela.

A feniletanolamina-N-metiltransferase (PNMT) catalisa a produção da epinefrina

A PNMT catalisa a *N*-metilação da norepinefrina para formar a **epinefrina** nas células produtoras de epinefrina da medula suprarrenal. Como a PNMT é solúvel, supõe-se que a conversão da norepinefrina em epinefrina ocorra no citoplasma. A síntese da PNMT é induzida pelos hormônios glicocorticoides que alcançam a medula suprarrenal pelo sistema portal intrassuprarrenal. Esse sistema especial assegura um gradiente de concentração de esteroides 100 vezes maior do que o do sangue arterial sistêmico, e essa alta concentração intrassuprarrenal parece ser necessária para a indução da PNMT.

A T_3 e a T_4 ilustram a diversidade da síntese de hormônios

A síntese da **tri-iodotironina** (T_3) e da **tetraiodotironina** (**tiroxina**; T_4) (ver Figura 41-2) ilustra muitos dos princípios da diversidade discutida neste capítulo. Esses hormônios exigem a presença de um elemento raro (iodo) para a sua bioatividade;

são sintetizados como parte de uma molécula precursora muito grande (tireoglobulina); são armazenados em um reservatório intracelular (coloide), e ocorre conversão periférica da T_4 em T_3, o qual é um hormônio muito mais ativo.

Os hormônios tireoidianos T_3 e T_4 são singulares, visto que o iodo (na forma de iodeto) constitui um componente essencial de ambos. Em quase todas as partes do mundo, o iodo é um componente escasso do solo, e, por essa razão, encontra-se em quantidades muito pequenas nos alimentos. Os organismos desenvolveram um mecanismo complexo para adquirir e reter esse elemento crucial a fim de convertê-lo em uma forma apropriada para incorporação em compostos orgânicos. Ao mesmo tempo, a glândula tireoide precisa sintetizar tironina a partir da tirosina, e essa síntese ocorre na tireoglobulina (**Figura 41-11**).

A **tireoglobulina** é o precursor da T_4 e da T_3. Trata-se de uma grande proteína glicosilada e iodada, com massa molecular de 660 kDa. O carboidrato constitui 8 a 10% do peso da tireoglobulina, enquanto o iodeto representa cerca de 0,2 a 1%, dependendo do teor de iodo da dieta. A tireoglobulina é constituída por duas subunidades grandes. Ela contém 115 resíduos de tirosina, e cada um desses resíduos constitui um sítio potencial de iodação. Cerca de 70% de iodeto da tireoglobulina estão presentes nos precursores inativos, a **monoiodotirosina (MIT)** e a **di-iodotirosina (DIT)**, enquanto 30% encontram-se na forma de **resíduos de iodotironil**, T_4 e T_3. Quando o suprimento de iodo é suficiente, a razão T_4:T_3 é de cerca de 7:1. Na **deficiência de iodo**, essa razão diminui, assim como a razão DIT:MIT. A tireoglobulina, uma molécula grande com cerca de 5.000 aminoácidos, assegura

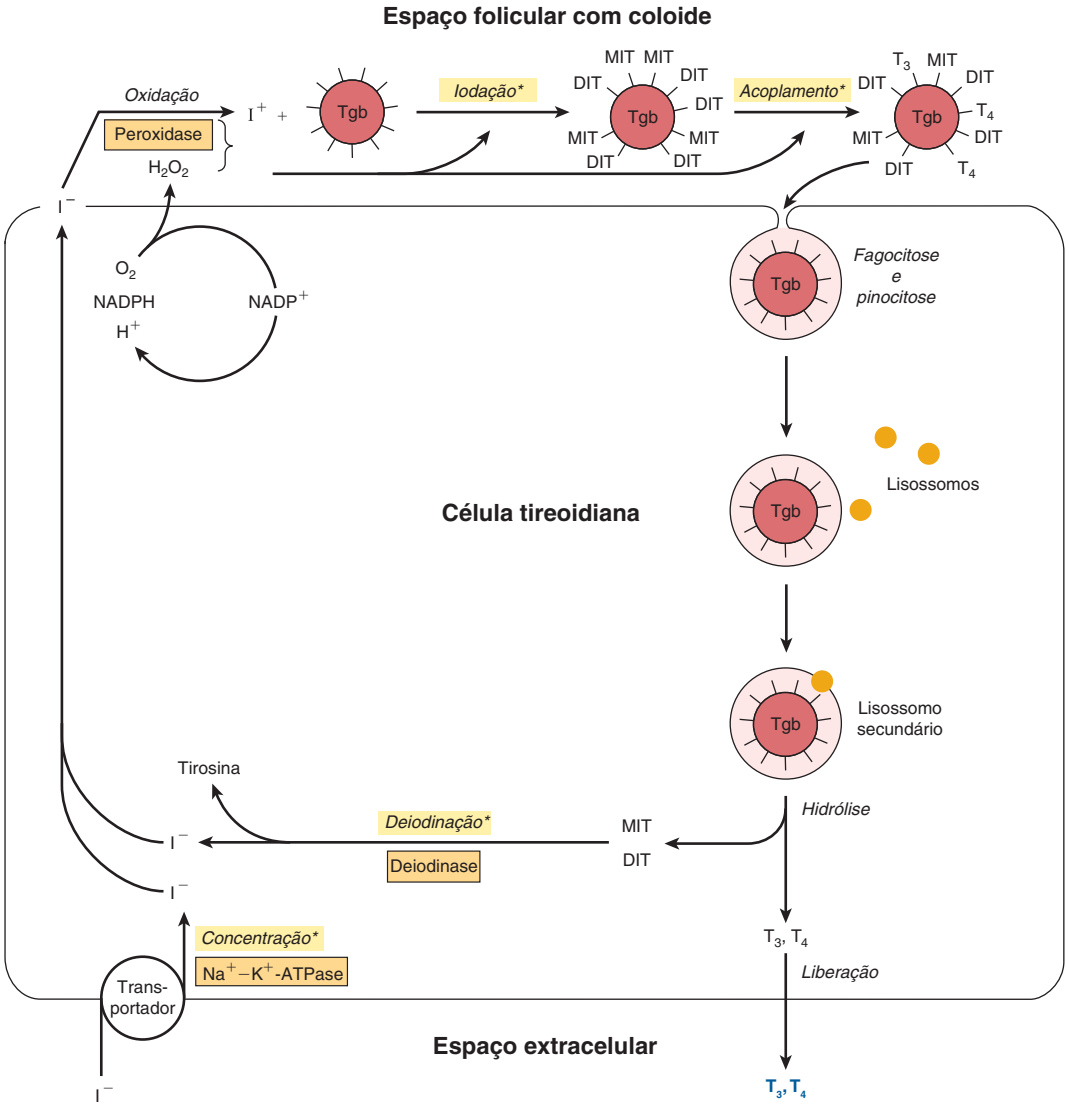


FIGURA 41-11 Modelo do metabolismo do iodeto no folículo da tiroide. Uma célula folicular está ilustrada de frente para o lúmen folicular (parte superior) e o espaço extracelular (parte inferior). O iodeto entra na tireoide principalmente por meio de um transportador (lado esquerdo inferior). A síntese de hormônio tireoidiano ocorre no espaço folicular por uma série de reações, muitas das quais são mediadas por peroxidases. Os hormônios tireoidianos, que são armazenados no coloide do espaço folicular, são liberados da tireoglobulina por hidrólise dentro da célula tireoidiana. (DIT, di-iodotirosina; MIT, monoiodotirosina; Tgb, tireoglobulina; T_3, tri-iodotironina; T_4, tetraiodotironina.) Os asteriscos indicam as etapas ou processos onde a ocorrência de deficiências enzimáticas hereditárias provoca bócio congênito e, com frequência, resultam em hipotireoidismo.

a conformação necessária para o acoplamento de tirosil e a organificação do iodeto necessários à formação dos hormônios tireoidianos com diaminoácidos. A tireoglobulina é sintetizada na porção basal da célula e desloca-se até o lúmen, onde constitui uma forma de armazenamento da T_3 e da T_4 no coloide. Na glândula tireoide normal, existe um suprimento desses hormônios por várias semanas. Dentro de poucos minutos após a estimulação da tireoide pelo TSH, o coloide entra novamente na célula, e observa-se um aumento acentuado na atividade dos fagolisossomos. Várias proteases ácidas e peptidases hidrolisam a tireoglobulina em seus aminoácidos constituintes, incluindo a T_4 e a T_3, que são descarregadas no espaço extracelular (ver Figura 41-11). Por conseguinte, a tireoglobulina é um pró-hormônio muito grande.

O metabolismo do iodeto envolve várias etapas distintas

A glândula tireoide tem a capacidade de concentrar o I^- contra um forte gradiente eletroquímico. Trata-se de um processo dependente de energia, que está ligado ao transportador de I^- tireoidiano dependente de Na^+-K^+-ATPase. A razão entre o iodeto da tireoide e o iodeto do soro (razão T:S) reflete a atividade desse transportador. Essa atividade é controlada principalmente pelo TSH e varia desde 500:1, em animais cronicamente estimulados com TSH, até 5:1 ou menos, em animais submetidos à hipofisectomia (sem TSH). Nos seres humanos, a razão T:S com uma dieta contendo um teor normal de iodo é de cerca de 25:1.

A glândula tireoide é o único tecido capaz de oxidar o I^- em um estado de valência mais alta, uma etapa obrigatória na organificação do I^- e na biossíntese dos hormônios tireoidianos. Essa etapa, que envolve uma peroxidase contendo heme, ocorre na superfície luminal da célula folicular. A tireoperoxidase, uma proteína tetramérica com massa molecular de 60 kDa, requer a presença de peróxido de hidrogênio como agente oxidante. Ocorre produção de H_2O_2 por uma enzima dependente de NADPH que se assemelha à citocromo *c* redutase. Diversos compostos inibem a oxidação do I^- e, portanto, a sua incorporação subsequente à MIT e à DIT. Os mais importantes desses compostos são os fármacos da tioureia. Esses compostos são usados como fármacos antitireoidianos, em virtude de sua capacidade de inibir a biossíntese dos hormônios tireoidianos nessa etapa. Quando ocorre iodação, o iodo não sai prontamente da tireoide. A tirosina livre pode ser iodada, porém não é incorporada às proteínas, já que não existe nenhum tRNA para reconhecer a tirosina iodada.

O acoplamento de duas moléculas de DIT para formar a T_4 – ou de uma molécula de MIT e uma molécula de DIT para formar a T_3 – ocorre dentro da molécula de tireoglobulina. Não foi identificada uma enzima de acoplamento separada, e, como se trata de um processo oxidativo, supõe-se que a mesma tireoperoxidase catalise essa reação ao estimular a formação de radicais livres da iodotirosina. Essa hipótese é sustentada pela observação de que os mesmos fármacos que inibem a oxidação de I^- também inibem o acoplamento. Os hormônios tireoidianos sintetizados continuam como partes integrais da tireoglobulina até que ela sofra degradação, conforme descrito anteriormente.

A deiodinase remove o I^- das moléculas inativas de monoiodotironina e di-iodotironina na glândula tireoide. Esse mecanismo assegura uma quantidade substancial do I^- usado na biossíntese da T_3 e da T_4. Uma deiodinase periférica nos tecidos-alvo, tais como a hipófise, os rins e o fígado, remove seletivamente o I^- da posição 5′ da T_4 para formar T_3 (ver Figura 41-2), que é uma molécula muito mais ativa. Nesse sentido, pode-se considerar a T_4 como um pró-hormônio, embora exiba alguma atividade intrínseca.

Vários hormônios são formados a partir de precursores peptídicos maiores

A formação das pontes de dissulfeto essenciais na insulina exige que esse hormônio seja, em primeiro lugar, sintetizado como parte de uma molécula precursora maior, denominada proinsulina. Do ponto de vista conceitual, esse processo assemelha-se ao exemplo dos hormônios tireoidianos, que só podem ser sintetizados na presença de uma molécula muito maior. Vários outros hormônios são sintetizados como parte de moléculas precursoras maiores, não em virtude de alguma exigência estrutural especial, mas sim como mecanismo para controlar a quantidade disponível do hormônio ativo. O PTH e a angiotensina II fornecem exemplos desse tipo de regulação. Outro exemplo interessante é a proteína POMC, que pode ser processada em muitos hormônios diferentes de acordo com o tecido específico. Esses exemplos são discutidos detalhadamente mais adiante.

A insulina é sintetizada como pré-pró-hormônio e modificada dentro das células β

A insulina possui uma estrutura heterodimérica AB, com uma ponte de dissulfeto intracadeia (A6-A11) e duas pontes de dissulfeto entre as cadeias (A7-B7 e A20-B19) (**Figura 41-12**). As cadeias A e B poderiam ser sintetizadas em laboratório, porém as tentativas de efetuar uma síntese bioquímica da molécula madura de insulina produziram resultados muito insatisfatórios. A razão disso ficou evidente quando foi descoberto que a insulina é sintetizada como **pré-pró-hormônio** (peso molecular de ~ 11.500), que é o protótipo dos peptídeos que são processados a partir de moléculas precursoras maiores. A sequência pré, ou líder, hidrofóbica de 23 aminoácidos direciona a molécula para dentro das cisternas do retículo endoplasmático e, em seguida, é removida. Essa remoção resulta na molécula de proinsulina com peso molecular de 9.000, que apresenta a conformação necessária para a formação apropriada e eficiente das pontes de dissulfeto. Conforme ilustrado na Figura 41-12, a sequência da proinsulina, que começa a partir da região aminoterminal, é a cadeia B – peptídeo conector (C) – cadeia A. A molécula de proinsulina sofre uma série de clivagens peptídicas em sítios específicos, resultando na formação de quantidades equimolares de insulina madura e peptídeo C. Essas clivagens enzimáticas estão resumidas na Figura 41-12.

O PTH é secretado na forma de um peptídeo de 84 aminoácidos

O precursor imediato do PTH é o pró-PTH, que difere do hormônio nativo de 84 aminoácidos pela presença de uma extensão aminoterminal hexapeptídica altamente básica. O principal produto genético e o precursor imediato do pró-PTH é o **pré-pró-PTH** de 115 aminoácidos. O pré-pró-PTH difere do pró-PTH pela presença de uma extensão aminoterminal adicional de 25

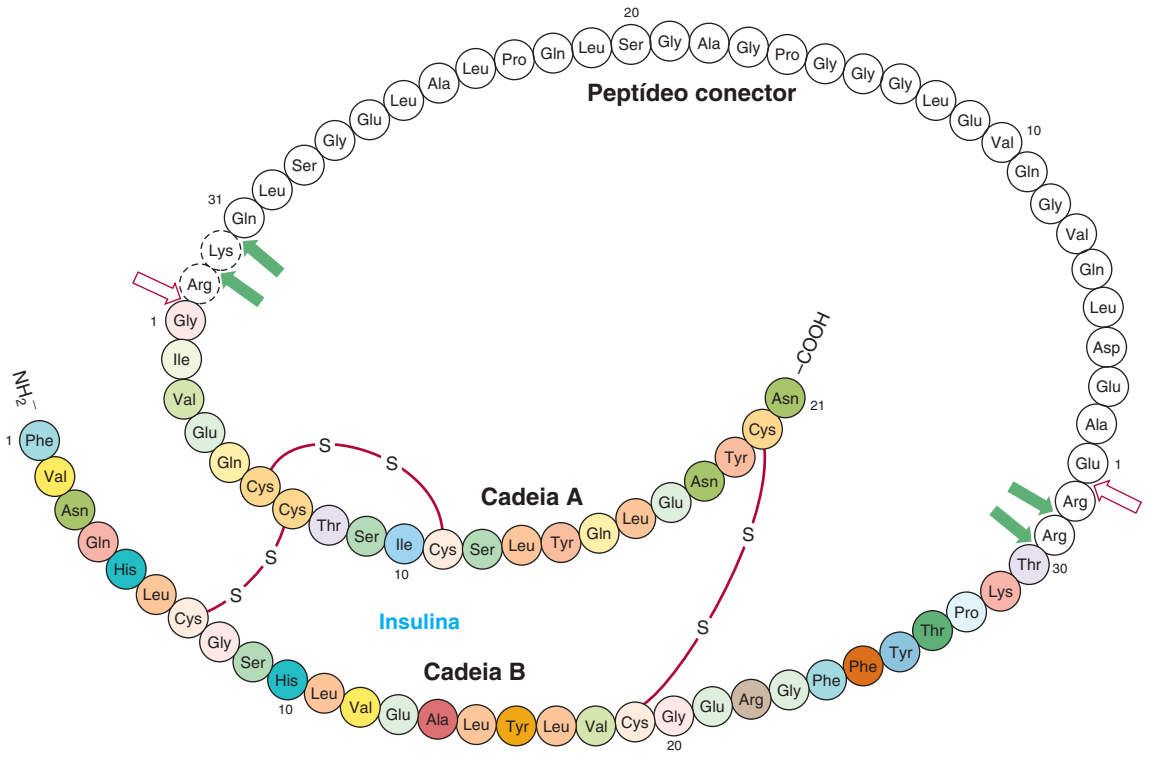


FIGURA 41-12 Estrutura da proinsulina humana. As moléculas da insulina e do peptídeo C estão ligadas em dois sítios por ligações dipeptídicas. Uma clivagem inicial por uma enzima semelhante à tripsina (setas transparentes), seguida de várias clivagens por uma enzima semelhante à carboxipeptidase (setas escuras), resulta na produção da molécula de insulina heterodimérica (AB) (colorida) e do peptídeo C (branco).

aminoácidos que, em comum com as outras sequências líderes ou de sinalização características das proteínas secretadas, é hidrofóbica. A **Figura 41-13** ilustra a estrutura completa do pré-pró-PTH, bem como as sequências do pró-PTH e do PTH. O PTH_{1-34} possui atividade biológica integral, e a região 25-34 é principalmente responsável pela ligação ao receptor.

A biossíntese do PTH e a sua secreção subsequente são reguladas pela concentração plasmática de cálcio ionizado (Ca^{2+}) por meio de um processo complexo. A ocorrência de uma redução aguda do Ca^{2+} resulta em acentuado aumento do mRNA do PTH, e esse processo é seguido de aumento na taxa de síntese e secreção do PTH. Entretanto, cerca de 80 a 90% do pró-PTH sintetizado não podem produzir o PTH intacto nas células ou no meio de incubação de sistemas experimentais. Esse achado levou à conclusão de que a maior parte do pró-PTH sintetizado sofre rápida degradação. Posteriormente, foi constatado que essa taxa de degradação diminui quando as concentrações de Ca^{2+} estão baixas e aumenta quando as concentrações de Ca^{2+} estão elevadas. Esses efeitos são mediados por um receptor de Ca^{2+} localizado na superfície da célula paratireoide. São produzidos fragmentos muito específicos do PTH durante a sua digestão proteolítica (Figura 41-13). Diversas enzimas proteolíticas, incluindo as catepsinas B e D, foram identificadas no tecido paratireoide. A catepsina B cliva o PTH em dois fragmentos: PTH_{1-36} e o PTH_{37-84}. O PTH_{37-84} não é degradado subsequentemente; entretanto, o PTH_{1-36} sofre clivagem rápida e progressiva em dipeptídeos e tripeptídeos. A maior parte da proteólise do PTH ocorre dentro da glândula, porém vários estudos confirmaram que, uma vez secretado, o PTH é degradado proteoliticamente em outros tecidos, particularmente o fígado, por mecanismos semelhantes.

A angiotensina II também é sintetizada a partir de um grande precursor

O sistema renina-angiotensina está envolvido na regulação da pressão arterial e do metabolismo eletrolítico (pela síntese de aldosterona). O principal hormônio envolvido nesses processos é a angiotensina II, um octapeptídeo formado a partir do angiotensinogênio (**Figura 41-14**). O angiotensinogênio, uma grande α_2-globulina produzida no fígado, é o substrato da renina, uma enzima sintetizada nas células justaglomerulares da arteríola aferente renal. Em virtude de sua localização, essas células são particularmente sensíveis a alterações da pressão arterial, e muitos dos reguladores fisiológicos da liberação de renina atuam por meio de barorreceptores renais. As células justaglomerulares também são sensíveis a mudanças nas concentrações de Na^+ e de Cl^- do líquido tubular renal; por conseguinte, qualquer combinação de fatores que diminua o volume de líquido (desidratação, queda da pressão arterial ou perda de líquido ou de sangue) ou que reduza a concentração de NaCl, estimula a liberação de renina. Os nervos simpáticos renais que terminam nas células justaglomerulares medeiam os efeitos posturais e do sistema nervoso central sobre a liberação de renina, independentemente dos efeitos dos barorreceptores e da concentração de sal, um mecanismo que envolve o receptor β-adrenérgico. A renina atua no substrato angiotensinogênio e produz a angiotensina I, um decapeptídeo.

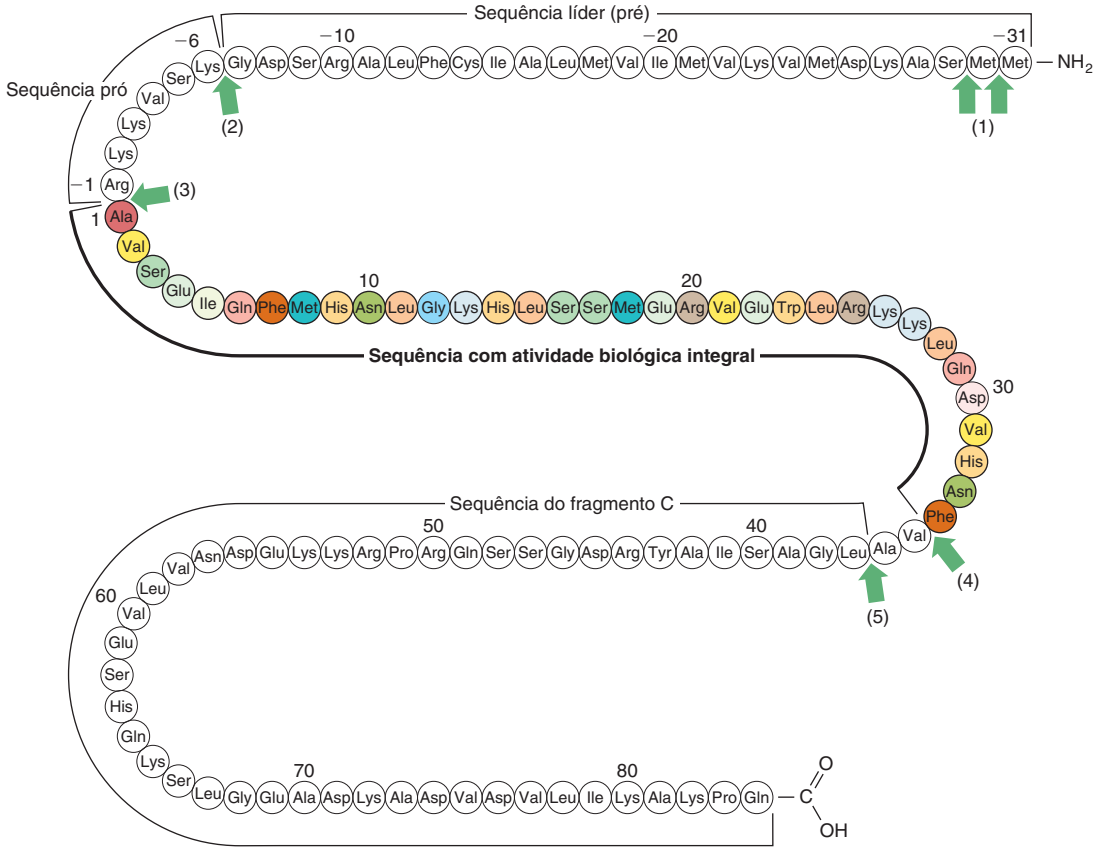


FIGURA 41-13 Estrutura do pré-pró-paratormônio bovino. As setas indicam os sítios clivados pelas enzimas de processamento na glândula paratiroide e no fígado, após a secreção do hormônio (1 a 5). A região biologicamente ativa da molécula (colorida) é ladeada pela sequência que não é necessária para a atividade nos receptores-alvo. (Ligeiramente modificada e reproduzida, com autorização, de Habener JF: Recent advances in parathyroid hormone research. Clin Biochem 1981;14:223. Copyright © 1981. Reimpressa com autorização da Elsevier.)

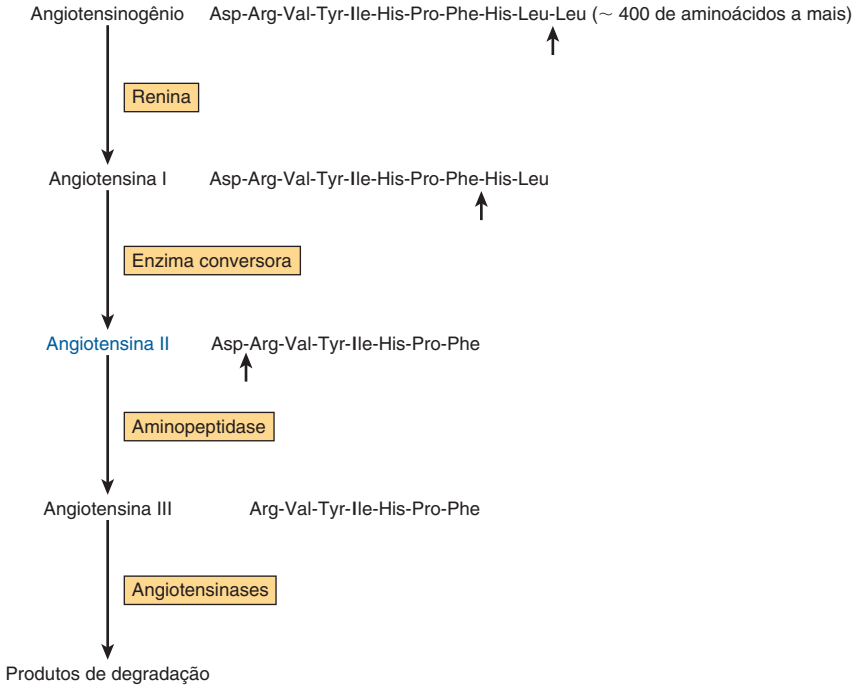


FIGURA 41-14 Síntese e metabolismo das angiotensinas. As setas pequenas indicam os locais de clivagem.

A enzima conversora de angiotensina, uma glicoproteína encontrada nos pulmões, na célula epitelial e no plasma, remove dois aminoácidos carboxiterminais do decapeptídeo angiotensina I para formar a angiotensina II, em uma etapa que não é considerada limitadora de velocidade. Vários análogos nonapeptídicos da angiotensina I e outros compostos atuam como inibidores competitivos da enzima conversora e são usados no tratamento da hipertensão dependente de renina. Esses agentes são denominados **inibidores** da **enzima conversora de angiotensina** (**ECA**). A angiotensina II aumenta a pressão arterial por meio de vasoconstrição da arteríola. Trata-se de uma substância vasoativa muito potente. Ela inibe a liberação de renina das células justaglomerulares e atua como potente regulador da síntese de aldosterona. Essas ações resultam em retenção de Na^+, expansão do volume e elevação da pressão arterial.

Em algumas espécies, a angiotensina II é convertida no heptapeptídeo angiotensina III (Figura 41-14), um estimulador igualmente potente da síntese de aldosterona. Nos seres humanos, o nível plasmático de angiotensina II é quatro vezes maior que o da angiotensina III, de modo que a maior parte dos efeitos é exercida pelo octapeptídeo. As angiotensinas II e III são rapidamente inativadas pelas angiotensinases.

A angiotensina II liga-se a receptores específicos existentes nas células da zona glomerulosa do córtex suprarrenal. A interação entre hormônio e receptor não ativa a adenilil-ciclase, e o AMPc não parece mediar a ação desse hormônio. As ações da angiotensina II, que consistem em estimular a conversão do colesterol em pregnenolona e a da corticosterona em 18-hidroxicorticosterona e aldosterona, podem envolver alterações da concentração de cálcio intracelular e dos metabólitos fosfolipídicos por mecanismos semelhantes aos descritos no Capítulo 42.

O processamento complexo gera a família de peptídeos da pró-opiomelanocortina (POMC)

A família da POMC consiste em peptídeos que atuam como hormônios (ACTH, LPH, MSH) e em outros que podem atuar como neurotransmissores ou neuromoduladores (endorfina) (**Figura 41-15**). A POMC é sintetizada na forma de uma molécula precursora de 285 aminoácidos e é processada de modo diferente em várias regiões da hipófise.

O gene da POMC é expresso nos lobos anterior e intermediário da hipófise. As sequências mais conservadas entre as espécies situam-se no fragmento aminoterminal, nas regiões do ACTH e da β-endorfina. A POMC ou produtos relacionados são encontrados em vários outros tecidos de vertebrados, como o cérebro, a placenta, o trato gastrintestinal, o aparelho reprodutor, os pulmões e os linfócitos.

A proteína POMC é processada de modo diferente no lobo anterior e no lobo intermediário da hipófise. O lobo intermediário é rudimentar nos seres humanos adultos, porém é ativo nos fetos humanos e em mulheres grávidas no final da gestação; é também ativo em muitas espécies animais. O processamento da proteína POMC nos tecidos periféricos (intestino, placenta e sistema reprodutor masculino) assemelha-se àquele observado no lobo intermediário. Existem três grupos de peptídeos básicos: (1) o ACTH, que pode dar origem ao α-MSH e ao peptídeo do lobo intermediário semelhante à corticotropina (CLIP); (2) a β-lipotropina (β-LPH), que pode gerar o γ-LPH, o β-MSH e a β-endorfina (e, portanto, as α- e as γ-endorfinas); e (3) um peptídeo aminoterminal grande, que gera o γ-MSH (não ilustrado). A diversidade desses produtos deve-se aos numerosos grupos de aminoácidos dibásicos que constituem locais potenciais de clivagem para enzimas semelhantes à tripsina. Todos os peptídeos mencionados são precedidos por resíduos Lys-Arg, Arg-Lys, Arg-Arg ou Lys-Lys. Após a clivagem do segmento do pré-hormônio, a próxima clivagem, tanto no lobo anterior quanto no intermediário, ocorre entre o ACTH e o β-LPH, resultando em um peptídeo aminoterminal com ACTH e um segmento de β-LPH (Figura 41-15). Subsequentemente, o $ACTH_{1-39}$ é clivado do peptídeo aminoterminal, e, no lobo anterior, não ocorre praticamente nenhuma clivagem adicional. No lobo intermediário, o $ACTH_{1-39}$ é clivado em α-MSH (resíduos 1 a 13) e no CLIP (18 a 39); o β-LPH (42 a 134) é convertido em γ-LPH (42 a 101) e em β-endorfina (104 a 134). O β-MSH (84 a 101) é derivado do γ‴-LPH, enquanto o γ-MSH (50 a 74) origina-se de um fragmento *N*-terminal (1 a 74) da POMC.

Esses peptídeos sofrem modificações extensas adicionais, específicas do tecido, que afetam a sua atividade. Essas modificações incluem fosforilação, acetilação, glicosilação e amidação.

As mutações do receptor do α-MSH estão associadas a uma forma comum de obesidade de início precoce. Essa observação redirecionou a atenção para os hormônios peptídeos da POMC.

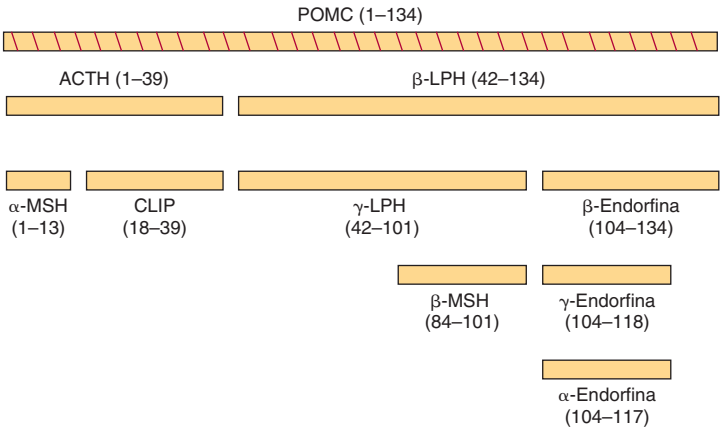


FIGURA 41-15 Produtos da clivagem da pró-opiomelanocortina (POMC). (CLIP, peptídeo do lobo intermediário semelhante à corticotropina; LPH, lipotropina; MSH, hormônio melanócito-estimulante.)

EXISTEM VARIAÇÕES NO ARMAZENAMENTO E NA SECREÇÃO DOS HORMÔNIOS

Conforme assinalado anteriormente, os hormônios esteroides e a $1,25(OH)_2$-D_3 são sintetizados em sua forma ativa final. São também secretados à medida que são produzidos, de modo que não existe nenhum reservatório intracelular desses hormônios. As catecolaminas, também sintetizadas na forma ativa, são armazenadas em grânulos das células cromafins da medula suprarrenal. Em resposta a uma estimulação neural apropriada, esses grânulos são liberados da célula por exocitose, e as catecolaminas são liberadas na circulação. Nas células cromafins, existe um suprimento de reserva de catecolaminas para muitas horas.

O PTH também ocorre em vesículas de armazenamento. De 80 a 90% do pró-PTH sintetizado são degradados antes de alcançar esse compartimento final de armazenamento, particularmente quando os níveis de Ca^{2+} estão elevados na célula paratireoide (ver parágrafos anteriores). O PTH é secretado quando o nível de Ca^{2+} está baixo nas células paratireoides, as quais contêm um suprimento do hormônio para várias horas.

O pâncreas humano secreta cerca de 40 a 50 unidades de insulina por dia, o que representa cerca de 15 a 20% do hormônio armazenado nas células β. A insulina e o peptídeo C (ver Figura 41-12) são normalmente secretados em quantidades equimolares. Assim, estímulos como a glicose, que provoca a secreção de insulina, desencadeiam o processamento da proinsulina como parte essencial da resposta secretora.

Existe um suprimento de T_3 e T_4 para várias semanas na tireoglobulina que está armazenada no coloide no lúmen dos folículos tireoidianos. Esses hormônios podem ser liberados com a estimulação do TSH. Trata-se do exemplo mais evidente de um pró-hormônio, visto que uma molécula contendo ~ 5.000 aminoácidos precisa ser em primeiro lugar sintetizada e, em seguida, decomposta para fornecer algumas moléculas dos hormônios ativos, T_4 e T_3.

A **Tabela 41-5** ilustra a diversidade no armazenamento e na secreção dos hormônios.

ALGUNS HORMÔNIOS POSSUEM PROTEÍNAS DE TRANSPORTE PLASMÁTICAS

Os hormônios da classe I são hidrofóbicos na sua natureza química e, portanto, não são muito solúveis no plasma. Esses hormônios, principalmente os esteroides e os hormônios tireoidianos, possuem proteínas de transporte especializadas no plasma que atendem a vários propósitos. Essas proteínas superam o problema da solubilidade e, assim, liberam o hormônio na célula-alvo. Além disso, asseguram um reservatório circulante do hormônio, que pode ser substancial, como no caso dos hormônios tireoidianos. Os hormônios quando estão ligados às proteínas de transporte, não podem ser metabolizados, o que prolonga a sua meia-vida plasmática ($t_{½}$). A afinidade de ligação de determinado hormônio pelo seu transportador determina a razão entre frações ligada e livre do hormônio. Isso é importante, uma vez que apenas a forma livre de um hormônio é biologicamente ativa. Em geral, a concentração plasmática do hormônio livre é muito baixa, da ordem de 10^{-15} a 10^{-9} mol/L. É importante distinguir entre proteínas plasmáticas de transporte e receptores hormonais. Ambos ligam-se aos hormônios, porém com características muito diferentes (**Tabela 41-6**).

Os hormônios hidrofílicos – geralmente da classe II e de estrutura peptídica – estão livremente solúveis no plasma e não necessitam de proteína de transporte. Hormônios como a insulina, o hormônio do crescimento, o ACTH e o TSH circulam na forma ativa livre e apresentam meias-vidas plasmáticas muito curtas. Uma notável exceção é o IGF-I, que é transportado a membros de uma família de ligação.

Os hormônios tireoidianos são transportados pela globulina de ligação dos hormônios tireoidianos

Muitos dos princípios discutidos anteriormente podem ser ilustrados na descrição das proteínas de ligação dos hormônios tireoidianos. De metade a dois terços da T_4 e da T_3 no organismo encontram-se em um reservatório fora da glândula tireoide. A maior parte circula na forma ligada, isto é, fixada a uma proteína de ligação específica, conhecida como **globulina de ligação da tiroxina** (**TBG**). A TBG, uma glicoproteína com massa molecular de 50 kDa, liga-se à T_4 e à T_3 e tem a capacidade de ligar-se a 20 μg/dL de plasma. Em condições normais, a TBG liga-se – de forma não covalente – a quase toda a T_4 e a T_3 presente no plasma, porém com afinidade maior pela T_4 do que pela T_3 (**Tabela 41-7**).

TABELA 41-5 Diversidade no armazenamento dos hormônios

Hormônio	Suprimento armazenado na célula
Esteroides e $1,25(OH)_2$-D_3	Nenhum
Catecolaminas e PTH	Horas
Insulina	Dias
T_3 e T_4	Semanas

TABELA 41-6 Comparação dos receptores com as proteínas de transporte

Característica	Receptores	Proteínas de transporte
Concentração	Muito baixa (milhares/célula)	Muito alta (bilhões/μL)
Afinidade de ligação	Alta (faixa de pmol/L a nmol/L)	Baixa (faixa de μmol/L)
Especificidade de ligação	Muito alta	Baixa
Saturabilidade	Sim	Não
Reversibilidade	Sim	Sim
Transdução de sinais	Sim	Não

TABELA 41-7 Comparação de T_4 e T_3 no plasma

Hormônio total (μg/dL)		Hormônio livre			$t_{½}$ no sangue (dias)
		Porcentagem do total	ng/dL	Molaridade	
T_4	8	0,03	~2,24	$3,0 \times 10^{-11}$	6,5
T_3	0,15	0,3	~0,4	$0,6 \times 10^{-11}$	1,5

A meia-vida plasmática da T_4 é de quatro a cinco vezes maior que a da T_3. A pequena fração não ligada (livre) é responsável pela atividade biológica. Por conseguinte, apesar da grande diferença na quantidade total, a fração livre da T_3 aproxima-se daquela da T_4, e, tendo em vista que a T_3 é intrinsecamente mais ativa do que a T_4, a maior parte da atividade biológica é atribuída à T_3. A TBG não se liga a nenhum outro hormônio.

Os glicocorticoides são transportados pela globulina de ligação dos corticosteroides

A hidrocortisona (cortisol) também circula no plasma na forma livre e na forma ligada às proteínas. A principal proteína de ligação no plasma é uma α-globulina, denominada **transcortina**, ou **globulina de ligação dos corticosteroides** (**CBG**). A CBG é sintetizada no fígado, e, à semelhança da TBG, a sua síntese é aumentada pelos estrogênios. A CBG liga-se à maior parte do hormônio quando os níveis plasmáticos de cortisol estão dentro da faixa normal; quantidades muito menores de cortisol ligam-se à albumina. A afinidade de ligação ajuda a determinar as meias-vidas biológicas de vários glicocorticoides. O cortisol liga-se firmemente à CBG e apresenta uma $t_{½}$ de 1,5 a 2 h, enquanto a corticosterona, que se liga menos firmemente, tem uma $t_{½}$ de < 1 h (**Tabela 41-8**). O cortisol livre (não ligado) constitui ~ 8% do total e representa a fração biologicamente ativa. A ligação à CBG não se limita aos glicocorticoides. A desoxicorticosterona e a progesterona interagem com a CBG com afinidade suficiente para competir com a ligação do cortisol. A aldosterona, o mineralocorticoide natural mais potente, não apresenta uma proteína de transporte específica no plasma. Os esteroides gonadais ligam-se muito fracamente à CBG (Tabela 41-8).

Os esteroides gonadais são transportados pela globulina de ligação dos hormônios sexuais

A maioria dos mamíferos, inclusive os seres humanos, possui uma β-globulina plasmática que se liga à testosterona com especificidade, afinidade relativamente alta e capacidade limitada (Tabela 41-8). Essa proteína, habitualmente denominada **globulina de ligação dos hormônios sexuais** (**SHBG**), ou globulina de ligação da testosterona-estrogênio (TEBG), é sintetizada no fígado. Sua produção é aumentada pelos estrogênios (as mulheres apresentam concentrações séricas de SHBG duas vezes maiores do que os homens), por determinados tipos de doença hepática e pelo hipertireoidismo; por outro lado, a síntese é diminuída pelos androgênios, pelo envelhecimento e pelo hipotireoidismo. Muitas dessas condições também afetam a síntese da CBG e da TBG. Como a SHBG e a albumina ligam-se a 97 a 99% da testosterona circulante, apenas uma pequena fração do hormônio na circulação encontra-se na forma livre (biologicamente ativa). A principal função da SHBG pode ser a de limitar a concentração sérica da testosterona livre. A testosterona liga-se à SHBG com mais afinidade do que o estradiol (Tabela 41-8). Portanto, uma alteração do nível de SHBG provoca uma maior variação nos níveis de testosterona livre do que nos níveis de estradiol livre.

Os estrogênios ligam-se à SHBG, e as progestinas, à CBG. A SHBG liga-se ao estradiol com afinidade cerca de cinco vezes menor do que a testosterona ou DHT, enquanto a progesterona e o cortisol têm pouca atividade com essa proteína (Tabela 41-8). Por outro lado, a progesterona e o cortisol ligam-se com afinidade quase igual à CBG, que, por sua vez, tem pouca afinidade pelo estradiol e ainda menos pela testosterona, DHT ou estrona.

Essas proteínas de ligação também asseguram um reservatório circulante de hormônio, e, devido à sua capacidade de ligação relativamente grande, elas provavelmente tamponam alterações súbitas do nível plasmático. Como as taxas de depuração metabólica desses esteroides estão inversamente relacionadas com a afinidade de sua ligação à SHBG, a estrona é depurada mais rapidamente do que o estradiol, que, por sua vez, sofre depuração mais rápida que a testosterona ou a DHT.

TABELA 41-8 Afinidades aproximadas dos esteroides pelas proteínas de ligação séricas

	SHBG[1]	CBG[1]
Di-hidrotestosterona	1	> 100
Testosterona	2	> 100
Estradiol	5	> 10
Estrona	> 10	> 100
Progesterona	> 100	~2
Cortisol	> 100	~3
Corticosterona	> 100	~5

[1] Afinidade expressa em K_d (nmol/L).

RESUMO

- A presença de um receptor específico define as células-alvo de determinado hormônio.
- Os receptores são proteínas que se ligam a hormônios específicos e que geram um sinal intracelular (acoplamento receptor-efetor).
- Alguns hormônios possuem receptores intracelulares, enquanto outros se ligam a receptores presentes na membrana plasmática.
- Os hormônios são sintetizados a partir de várias moléculas precursoras, incluindo colesterol, a própria tirosina e todos os aminoácidos constituintes dos peptídeos e das proteínas.
- Vários processos de modificação alteram a atividade dos hormônios. Por exemplo, muitos hormônios são sintetizados a partir de moléculas precursoras maiores.

- O complemento de enzimas em determinado tipo celular possibilita a síntese de uma classe específica de hormônios esteroides.
- Os hormônios lipossolúveis ligam-se, em sua maioria, a proteínas transportadoras plasmáticas bastante específicas.

REFERÊNCIAS

Bain DL, Heneghan AF, Connaghan-Jones KD, et al: Nuclear receptor structure: implications for function. Ann Rev Physiol 2007;69:201.

Bartalina L: Thyroid hormone-binding proteins: update 1994. Endocr Rev 1994;13:140.

Beato M, Herrlich P, Schütz G: Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. Cell 1995;83:851.

Cheung E, Kraus WL: Genomic Analyses of Hormone Signaling and Gene Regulation. Annu Rev Physiol 2010;72:191–218.

Cristina Casals-Casas C, Desvergne B: Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption. Annu Rev Physiol 2011;73:23.1–23.28.

Dai G, Carrasco L, Carrasco N: Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. Nature 1996;379:458.

DeLuca HR: The vitamin D story: a collaborative effort of basic science and clinical medicine. FASEB J 1988;2:224.

Douglass J, Civelli O, Herbert E: Polyprotein gene expression: Generation of diversity of neuroendocrine peptides. Annu Rev Biochem 1984;53:665.

Farooqi IS, O'Rahilly S: Monogenic obesity in humans. Ann Rev Med 2005;56:443.

Miller WL: Molecular biology of steroid hormone biosynthesis. Endocr Rev 1988;9:295.

Nagatsu T: Genes for human catecholamine-synthesizing enzymes. Neurosci Res 1991;12:315.

Russell DW, Wilson JD: Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. Annu Rev Biochem 1994;63:25.

Russell J, Bar A, Sherwood LM, et al: Interaction between calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D_3 in the regulation of preproparathyroid hormone and vitamin D receptor mRNA in avian parathyroids. Endocrinology 1993;132:2639.

Steiner DF, Smeekens SP, Ohagi S, et al: The new enzymology of precursor processing endoproteases. J Biol Chem 1992;267:23435.

Taguchi A, White M: Insulin-like signaling, nutrient homeostasis, and life span. Ann Rev Physiol 2008;70:191.

CAPÍTULO

42

Ação dos Hormônios e Transdução de Sinais

P. Anthony Weil, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Explicar os papéis do estímulo, da liberação de hormônios, da geração de sinal e da resposta efetora em uma variedade de processos fisiológicos regulados por hormônios.
- Explicar o papel dos receptores e das proteínas G de ligação de GTP na transdução de sinal hormonal, particularmente no que se refere à geração de mensageiros secundários.
- Reconhecer os padrões complexos de comunicação cruzada da via de transdução de sinais em relação à mediação de processos fisiológicos complicados.
- Compreender os papéis essenciais que a modificação pós-tradução de proteína-ligante, proteína-proteína, proteína (p. ex., fosforilação e acetilação) e as interações proteína-DNA desempenham na mediação dos processos fisiológicos governados por hormônios.
- Reconhecer que os receptores modulados por hormônios, os mensageiros secundários e as moléculas de sinalização associadas representam uma rica fonte para o desenvolvimento de fármacos potenciais, tendo em vista os seus papéis fundamentais na regulação da fisiologia.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

As adaptações homeostáticas produzidas por um organismo face a um ambiente em constante mudança são realizadas, em grande parte, por meio de alterações na atividade e na quantidade das proteínas. Os hormônios proporcionam um importante mecanismo para facilitar essas mudanças. Uma interação entre hormônio e receptor leva à geração de um sinal intracelular que pode regular a atividade de determinado conjunto de genes, alterando, assim, a quantidade de certas proteínas na célula-alvo, ou afetar a atividade de proteínas específicas, incluindo enzimas e proteínas transportadoras ou de canais. O sinal pode influenciar a localização das proteínas na célula e também pode afetar processos gerais, como a síntese proteica, o crescimento celular e a replicação, frequentemente por meio de efeitos sobre a expressão dos genes. Outras moléculas de sinalização – incluindo as citocinas, as interleucinas, os fatores de crescimento e os metabólitos – utilizam alguns dos mesmos mecanismos gerais e mesmas vias de transdução de sinais. A produção e a liberação excessivas, deficientes ou inapropriadas de hormônios e das moléculas reguladoras constituem importantes causas de doença. Muitos agentes farmacoterapêuticos são desenvolvidos com o propósito de corrigir ou de influenciar de algum modo as vias discutidas neste capítulo.

OS HORMÔNIOS TRANSDUZEM SINAIS PARA AFETAR OS MECANISMOS HOMEOSTÁTICOS

A **Figura 42-1** ilustra as etapas gerais envolvidas na produção de uma resposta coordenada a determinado estímulo. O estímulo pode ser um desafio ou uma ameaça ao organismo, a um determinado órgão ou à integridade de uma única célula. O reconhecimento do estímulo constitui a primeira etapa da resposta adaptativa. Em um organismo, isso geralmente envolve o sistema nervoso e os sentidos especiais (visão, audição, sensibilidade à dor, olfato e sensibilidade tátil). No nível orgânico ou celular, o reconhecimento envolve fatores físico-químicos, como o pH, a pressão de O_2, a temperatura, o suprimento de nutrientes, os metabólitos deletérios e a osmolaridade. O reconhecimento apropriado resulta na liberação de um ou mais hormônios e controlam a geração da resposta adaptativa necessária. Para o propósito dessa discussão, os hormônios são classificados conforme descrito no Capítulo 41, isto é, com base na localização de seus receptores celulares específicos e no tipo de sinais gerados. Os hormônios do grupo I interagem com receptores intracelulares, enquanto os hormônios do grupo II atuam em locais de reco-

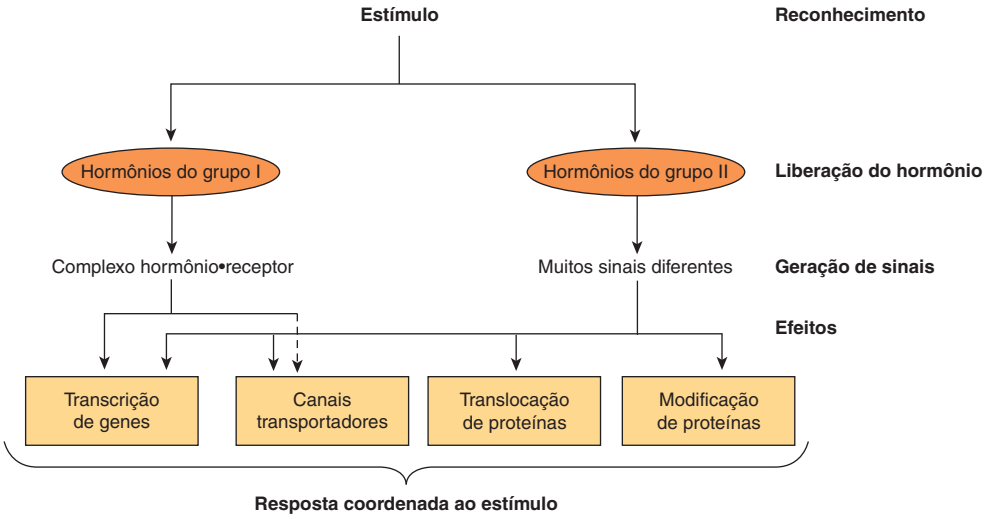


FIGURA 42-1 Atuação hormonal nas respostas a determinado estímulo. Um desafio à integridade do organismo desencadeia uma resposta, que inclui a liberação de um ou mais hormônios. Esses hormônios geram sinais nas células-alvo ou em seu interior, e regulam uma variedade de processos biológicos que asseguram uma resposta coordenada ao estímulo ou desafio. Ver um exemplo específico na Figura 42-8.

nhecimento de receptores localizados na superfície extracelular da membrana plasmática das células-alvo. As citocinas, as interleucinas e os fatores de crescimento também devem ser incluídos nesta última categoria. Essas moléculas, que são de importância fundamental na adaptação homeostática, são hormônios no sentido de que eles são sintetizados em células específicas, exercem o equivalente das ações autócrinas, parácrinas e endócrinas, ligam-se a receptores de superfície celular e ativam muitas das mesmas vias de transdução de sinais utilizadas pelos hormônios mais tradicionais do grupo II.

GERAÇÃO DO SINAL

O complexo ligante-receptor constitui o sinal para os hormônios do grupo I

Os hormônios lipofílicos do grupo I difundem-se através da membrana plasmática de todas as células, porém só encontram seus receptores intracelulares específicos de alta afinidade nas células-alvo. Esses receptores podem estar localizados no citoplasma ou no núcleo dessas células. Inicialmente, o complexo hormônio-receptor sofre uma **reação de ativação**. Conforme ilustrado na **Figura 42-2**, a ativação do receptor ocorre por meio de pelo menos dois mecanismos. Por exemplo, os glicocorticoides sofrem difusão através da membrana plasmática e encontram seus respectivos receptores no citoplasma das células-alvo. A ligação do ligante ao receptor produz uma mudança conformacional do receptor, levando à dissociação da proteína de choque térmico 90 (hsp90). Essa etapa parece ser necessária para a localização nuclear subsequente do receptor de glicocorticoides, o qual também contém uma sequência de localização nuclear, que, nessa etapa, está livre para facilitar a translocação do citoplasma ao núcleo. O receptor ativado é transferido para o núcleo (Figura 42-2) e liga-se com alta afinidade a uma sequência específica do DNA, denominada **elemento de resposta hormonal** (**HRE**). No caso ilustrado, trata-se de um elemento de resposta aos glicocorticoides ou GRE. A **Tabela 42-1** apresenta as sequências de consenso dos HRE. O complexo ligante-receptor ligado

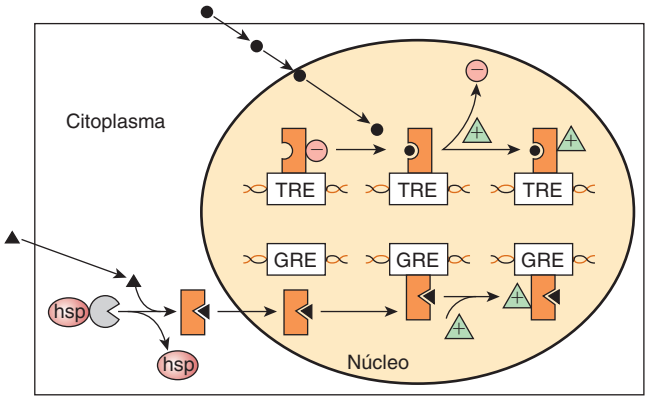


FIGURA 42-2 Regulação da expressão gênica por dois hormônios diferentes da classe I, o hormônio tireoidiano e os glicocorticoides. Os hormônios esteroides hidrofóbicos facilmente têm acesso ao compartimento citoplasmático das células-alvo por difusão através da membrana plasmática. Os hormônios glicocorticoides (triângulos pretos) encontram seus respectivos receptores (GR) no citoplasma, onde o GR existe na forma de um complexo com a proteína de choque térmico 90 (hsp). A ligação do ligante provoca dissociação da hsp e uma mudança de conformação do receptor. Em seguida, o complexo receptor-ligante atravessa a membrana nuclear e liga-se ao DNA com especificidade e alta afinidade a um elemento de resposta aos glicocorticoides (GRE). Esse evento afeta a arquitetura de diversos correguladores da transcrição (triângulos verdes), dando início a uma transcrição aumentada. Por outro lado, os hormônios tireoidianos e o ácido retinoico (·) entram diretamente no núcleo, onde seus respectivos receptores heterodiméricos (TR-RXR; ver Figura 42-12) já estão ligados aos elementos de resposta apropriados com um complexo repressor de transcrição associado (círculos vermelhos). Ocorre ligação do complexo hormônio-receptor, que mais uma vez induz mudanças na conformação do receptor, resultando em uma reorganização das interações entre receptor (TR) e corregulador (ou seja, moléculas como N-CoR ou SMRT [ver Tabela 42-6]). A ligação do ligante provoca dissociação do complexo repressor do receptor, possibilitando a montagem do complexo ativador, que consiste no TR-TRE e coativador. Em seguida, o gene é ativamente transcrito.

TABELA 42-1 As sequências de DNA de vários elementos de resposta hormonal (HRE)[1]

Hormônio ou efetor	HRE	Sequência do DNA
Glicocorticoides Progestinas Mineralocorticoides Androgênios	GRE PRE MRE ARE	GGTACA NNN TGTTCT
Estrogênios	ERE	AGGTCA --- TGACCT
Hormônio tireoidiano Ácido retinoico Vitamina D	TRE RARE VDRE	AGGTCA N1-5 AGGTCA
AMPc	CRE	TGACGTCA

[1] As letras referem-se aos nucleotídeos; N significa qualquer um dos quatro que podem ser utilizados nessa posição. As setas que apontam para direções contrárias ilustram os palíndromos invertidos ligeiramente imperfeitos, presentes em muitos HREs; em alguns casos, essas áreas são denominadas "meios-sítios de ligação" ou meio-sítios, visto que cada uma liga-se a um monômero do receptor. O GRE, o PRE, o MRE e o ARE consistem na mesma sequência de DNA. A especificidade pode ser conferida pela concentração intracelular do ligante ou do receptor hormonal, pelo flanqueamento das sequências de DNA não incluídas no consenso ou por outros elementos acessórios. Um segundo grupo de HRE inclui aqueles dos hormônios tireoidianos, dos estrogênios, do ácido retinoico e da vitamina D. Esses HRE são semelhantes, exceto no que se refere à orientação e ao espaçamento entre os meios palíndromos. O espaçamento determina a especificidade do hormônio. O VDRE ($N = 3$), o TRE ($N = 4$) e o RARE ($N = 5$) ligam-se a repetições diretas, e não a repetições invertidas. Outro membro da superfamília dos receptores de esteroides, o receptor de retinoide X (RXR), forma heterodímeros com o VDR, o TR e o RARE, constituindo as formas funcionais desses fatores de transação. O AMPc afeta a transcrição gênica por meio do CRE.

ao DNA funciona como um sítio de ligação de alta afinidade para uma ou mais proteínas coativadoras, e, quando isso ocorre, inicia-se a transcrição genética acelerada. Por outro lado, determinados hormônios, como os hormônios tireoidianos e os retinoides, difundem-se do líquido extracelular através da membrana plasmática e dirigem-se diretamente ao núcleo. Neste caso, o respectivo receptor já está ligado ao HRE (neste exemplo, ao elemento de resposta ao hormônio tireoidiano [TER]). Todavia, esse receptor ligado ao DNA não consegue ativar a transcrição pelo fato de existir em um complexo com um correpressor. Na verdade, esse complexo receptor-correpressor atua como repressor ativo da transcrição gênica. A associação do ligante a esses receptores resulta na dissociação do(s) correpressor(es). Nessa etapa, o complexo ligante-receptor é capaz de ligar-se com alta afinidade a um ou mais coativadores, resultando no recrutamento da RNA-polimerase II e GTFs, com ativação da transcrição genética. A relação dos receptores de hormônios com outros receptores nucleares e com correguladores é discutida de modo mais detalhado adiante.

Ao afetar seletivamente a transcrição gênica e a consequente produção dos mRNA-alvo apropriados, as quantidades de proteínas específicas são alteradas, e os processos metabólicos são influenciados. A ação de cada um desses hormônios é muito específica; em geral, um determinado hormônio afeta < 1% dos genes, do mRNA ou das proteínas de uma célula-alvo; ocasionalmente, apenas alguns são afetados. As ações nucleares dos hormônios esteroides, tireoidianos e retinoides estão bem definidas. As evidências sugerem, em sua maioria, que esses hormônios exercem seu efeito predominante ao modular a transcrição dos genes, porém eles – e muitos dos hormônios incluídos nas outras classes descritas adiante – podem atuar em qualquer etapa da "via de informação", conforme ilustrado na **Figura 42-3**, para controlar a expressão de genes específicos e, por fim, uma resposta biológica. Foram também descritas ações diretas dos esteroides no citoplasma e em várias organelas e membranas. Recentemente, foram implicados microRNAs na mediação de algumas das diversas ações do hormônio peptídico insulina.

OS HORMÔNIOS DO GRUPO II (PEPTÍDEOS E CATECOLAMINAS) POSSUEM RECEPTORES DE MEMBRANA E UTILIZAM MENSAGEIROS INTRACELULARES

Muitos hormônios são hidrossolúveis, não possuem proteínas de transporte (e, portanto, apresentam uma meia-vida plasmática curta) e desencadeiam uma resposta ao ligarem-se a um receptor localizado na membrana plasmática (Tabelas 41-3 e 41-4). O mecanismo de ação desse grupo de hormônios pode ser descrito de modo mais apropriado em termos dos **sinais intracelulares** que eles geram. Esses sinais incluem o **AMPc** (AMP cíclico; ácido 3′,5′-adenílico; ver Figura 19-5), um nucleotídeo derivado do ATP pela ação da adenilil-ciclase; o **GMPc**, um nucleotídeo formado pela guanilil-ciclase ; o **Ca^{2+}**; e os **fosfatidilinositídeos**; **tais moléculas pequenas são denominadas mensageiros secundários**, visto que a sua síntese é deflagrada pela presença do hormônio primário (molécula) ligando-se a seu receptor. Muitos desses mensageiros secundários afetam a transcrição dos genes, conforme descrito no parágrafo anterior; todavia, eles também influenciam uma variedade de outros processos biológicos, conforme ilustrado na Figura 42-3.

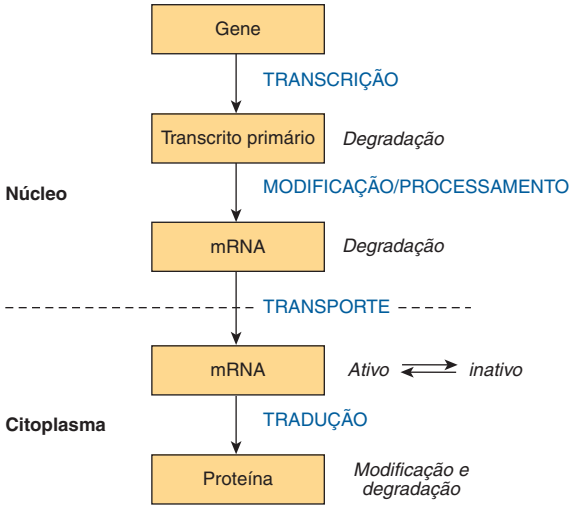


FIGURA 42-3 A "Via de informação". A informação flui do gene para o transcrito primário, para o mRNA e para a proteína. Os hormônios podem influenciar qualquer uma das etapas envolvidas e são capazes de afetar as taxas de processamento, degradação ou modificação dos vários produtos.

Receptores acoplados à proteína G

Muitos dos hormônios do grupo II ligam-se a receptores que se acoplam aos efetores por meio de um intermediário, a **proteína de ligação de GTP (proteína G)**. **Com frequência, esses receptores apresentam domínios hidrofóbicos que atravessam sete vezes a membrana de um lado ao outro**. Isso está ilustrado pelas sete hélices interconectadas que se estendem por meio da bicamada lipídica na **Figura 42-4**. Os receptores dessa classe, que transduzem o sinal por meio de intermediários de proteína ligados ao nucleotídeo de guanina, são conhecidos como **receptores acoplados à proteína G (GPCR)**. Até o momento, foram identificados centenas de genes para receptores ligados à proteína G; isso representa a maior família de receptores de superfície celular nos seres humanos. Uma ampla variedade de respostas é mediada pelos GPCRs.

O AMPc é o sinal intracelular de muitas respostas

O AMP cíclico foi o primeiro sinal de mensageiro secundário intracelular identificado nas células dos mamíferos. Existem vários componentes que constituem um sistema para a geração, a degradação e a ação do AMPc.

Adenilil-ciclase

Diferentes hormônios peptídicos podem estimular (e) ou inibir (i) a produção do AMPc pela adenilil-ciclase, que é codificada por, no mínimo, nove genes diferentes (**Tabela 42-2**). Dois sistemas paralelos, um estimulador (e) e um inibitório (i), convergem para uma molécula catalítica (C). Cada um consiste em um receptor, R_e ou R_i e um complexo regulador G_e e G_i. A G_e e a G_i consistem, cada uma delas, em uma **proteína G heterotrimérica composta de subunidades α, β e γ**. Como a subunidade α na G_e difere daquela da G_i, as proteínas, que são produtos de genes distintos, são designadas como α_e e α_i. As subunidades α ligam-se aos nucleotídeos de guanina. As subunidades β e γ estão sempre associadas (βγ) e parecem funcionar como um heterodímero. A ligação de um hormônio ao R_e ou ao R_i resulta em ativação da G mediada pelo receptor, que acarreta a troca do GDP pelo GTP em α e dissociação concomitante do βγ de α.

A proteína α_e possui atividade intrínseca de GTPase. A forma ativa, α_e.GTP, é inativada pela hidrólise do GTP em GDP; em seguida, o complexo trimérico G_e (αβγ) é novamente formado e está pronto para outro ciclo de ativação. As toxinas do cólera e da

TABELA 42-2 Subclassificação dos hormônios do grupo II.A

Hormônios que estimulam a adenilil-ciclase (H_E)	Hormônios que inibem a adenilil-ciclase (H_I)
ACTH	Acetilcolina
ADH	α_2-Adrenérgicos
β-Adrenérgicos	Angiotensina II
Calcitonina	Somatostatina
CRH	
FSH	
Glucagon	
hCG	
LH	
LPH	
MSH	
PTH	
TSH	

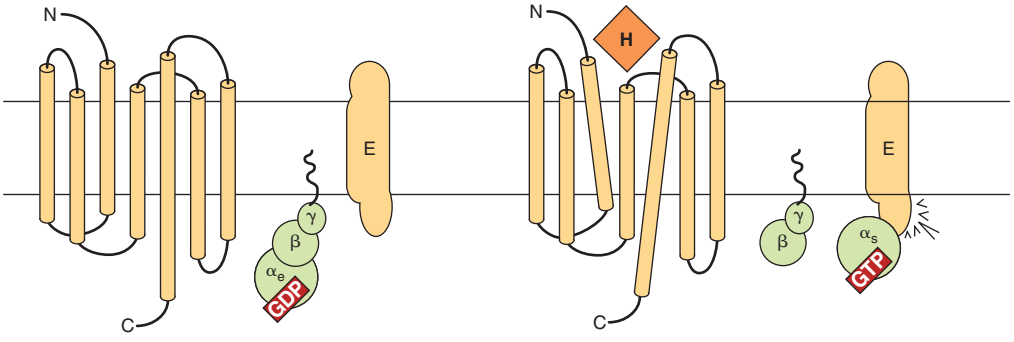


FIGURA 42-4 Componentes do sistema efetor de receptor hormonal-proteína G. Os receptores que se acoplam aos efetores por meio de proteínas G (GPCR) geralmente apresentam domínios que atravessam sete vezes a membrana de um lado ao outro. Na ausência do hormônio (**à esquerda**), o complexo de proteína G heterotrimérico (α, β, γ) encontra-se em uma forma inativa ligada ao guanosina difosfato (GDP), e, provavelmente, não está associado ao receptor. Esse complexo está ancorado na membrana plasmática por meio de grupos prenilados presentes nas subunidades βγ (**linhas onduladas**) e, talvez, por grupos miristoilados nas subunidades α (não ilustrados). Com a ligação do hormônio (H) ao receptor, ocorre supostamente uma mudança na conformação do receptor – indicada pelos domínios transmembrana inclinados – e ativação do complexo da proteína G. Isso resulta da troca do GDP pelo guanosina trifosfato (GTP) na subunidade α quando então ocorre dissociação de α e βγ. A subunidade α liga-se ao efetor (E) e o ativa. O E pode ser adenilil-ciclase, ou canais de Ca^{2+}, Na^+ ou Cl^- (α_e), ou pode consistir em um canal K^+ (α_i) fosfolipase Cβ (α_q) ou GMPc fosfodiesterase (α_t). A subunidade βγ também pode exercer ações diretas sobre o E. (Modificada e reproduzida, com autorização, de Granner DK in: *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*, 2nd ed. Becker KL (editor). Lippincott, 1995.)

coqueluche catalisam a ADP-ribosilação de a_e e $\alpha_{i\text{-}2}$ (ver **Tabela 42-3**), respectivamente. No caso de α_e, essa modificação suprime a atividade intrínseca da GTPase; por conseguinte, a α_e não pode se reassociar com βγ e, assim, é ativada de modo irreversível. A ADP-ribosilação de $\alpha_{i\text{-}2}$ impede a dissociação de $\alpha_{i\text{-}2}$ de βγ e, portanto, não pode haver formação de $\alpha_{i\text{-}2}$ livre. Portanto, a atividade de α_e nessas células ocorre sem oposição.

Existe uma grande família de proteínas G, que faz parte da superfamília das GTPase. A família das proteínas G é classificada de acordo com a homologia das sequências em quatro subfamílias, conforme ilustrado na Tabela 42-3. Existem 21 genes para a subunidade α, 5 para a subunidade β e 8 para a subunidade γ. Várias combinações dessas subunidades proporcionam um grande número de possíveis complexos de αβγ e ciclases.

As subunidades α e o complexo βγ exercem ações independentes daquelas da adenilil-ciclase (ver Figura 42-4 e Tabela 42-3). Algumas formas de α_i estimulam os canais de K^+ e inibem os canais de Ca^{2+}, enquanto algumas moléculas de α_e produzem efeitos opostos. Os membros da família G_q ativam o grupo de enzimas da fosfolipase C. Os complexos βγ foram associados à estimulação dos canais de K^+ e à ativação da fosfolipase C. As proteínas G estão envolvidas em muitos processos biológicos importantes, além da ação hormonal. Exemplos notáveis incluem o olfato (α_{OLF}) e a visão (α_t). Alguns exemplos estão listados na Tabela 42-3. Os GPCRs estão implicados em algumas doenças e constituem alvos importantes de agentes farmacêuticos.

Proteinoquinase

Conforme discutido no Capítulo 38, o AMPc nas células procarióticas liga-se a uma proteína específica, denominada proteína reguladora de catabólitos (CRP), que se liga diretamente ao DNA e influencia a expressão dos genes. Em contrapartida, nas células eucarióticas, o AMPc liga-se uma proteinoquinase denominada **proteinoquinase A** (**PKA**), uma molécula heterotetramérica que consiste em duas subunidades reguladoras (R) e duas subunidades catalíticas (C). A ligação do AMPc resulta na seguinte reação:

$$4\ \text{AMPc} + R_2C_2 \rightleftarrows R_2.(4\ \text{AMPc}) + 2C$$

O complexo R_2C_2 carece de atividade enzimática, porém a ligação do AMPc pela subunidade R induz a dissociação do complexo R-C, ativando, portanto, este último (**Figura 42-5**). A subunidade C ativa catalisa a transferência do fostato γ do ATP para um resíduo de serina ou de treonina em uma variedade de proteínas. Os sítios de fosforilação de consenso são -ArgArg/Lys-X-Ser/Thr- e -Arg-Lys-X-X-Ser-, onde X pode ser qualquer aminoácido.

Originalmente, as atividades das proteinoquinases eram descritas como "dependentes de AMPc" ou "independentes de AMPc". Essa classificação foi modificada, já que, atualmente, a fosforilação proteica é reconhecida como um importante mecanismo de regulação. Hoje em dia, já foram descritas várias centenas de proteinoquinases. As quinases estão relacionadas na sua sequência e estrutura dentro do domínio catalítico, porém cada uma delas é uma molécula singular que exibe considerável variabilidade no que se refere à composição das subunidades, peso molecular, autofosforilação, K_m para o ATP e especificidade de substrato. Ambas as atividades de quinase e de proteína fosfatase podem ser marcadas pela interação com proteínas específicas de ligação de quinases. No caso da PKA, essas proteínas de endereçamento são denominadas **AKAPs** (**proteínas de ancoragem de**

TABELA 42-3 Classes e funções de proteínas G selecionadas[1]

Classe ou tipo	Estímulos	Efetor	Efeito
G_e			
α_e	Glucagon, β-adrenérgicos	↑ Adenilil-ciclase	Gliconeogênese, lipólise, glicogenólise
		↑ Canais de Ca^{2+}, Cl^- e Na^+ cardíacos	Olfato
α_{olf}	Odorífero	↑ Adenilil-ciclase	
G_i			
$\alpha_{i\text{-}1,2,3}$	Acetilcolina, α_2-adrenérgicos	↓ Adenilil ciclase	Redução da frequência cardíaca
		↑ Canais de potássio	
	M_2 colinérgicos	↓ Canais de cálcio	
α_o	Opioides, endorfinas	↑ Canais de potássio	Atividade elétrica neuronal
α_t	Luz	↑ GMPc- fosfodiesterase	Visão
G_q			
α_q	M_1 colinérgicos		
	α_1-Adrenérgicos	↑ Fosfolipase C-β1	↓ Contração muscular
			e
α_{11}	α_1-Adrenérgicos	↑ Fosfolipase C-β2	↓ Pressão sanguínea
G_{12}			
α_{11}	Trombina	Rho	Alteração do formato da célula

[1] As quatro classes ou famílias principais de proteínas G dos mamíferos (G_e, G_i, G_q, e G_{12}) baseiam-se na homologia das sequências das proteínas. Os membros representativos de cada classe estão ilustrados, juntamente com os estímulos conhecidos, os efetores e os efeitos biológicos bem definidos. Foram identificadas nove isoformas de adenilil-ciclase (isoformas I a IX). Todas as isoformas são estimuladas pela α_e; as isoformas α_i inibem os tipos V e VI, enquanto a α_0 inibe os tipos I e V. Foram identificadas pelo menos 16 subunidades α diferentes.

Fonte: Modificada e reproduzida, com autorização, de Granner DK in: *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism,* 2nd ed. Becker KL (editor). Lippincott, 1995.

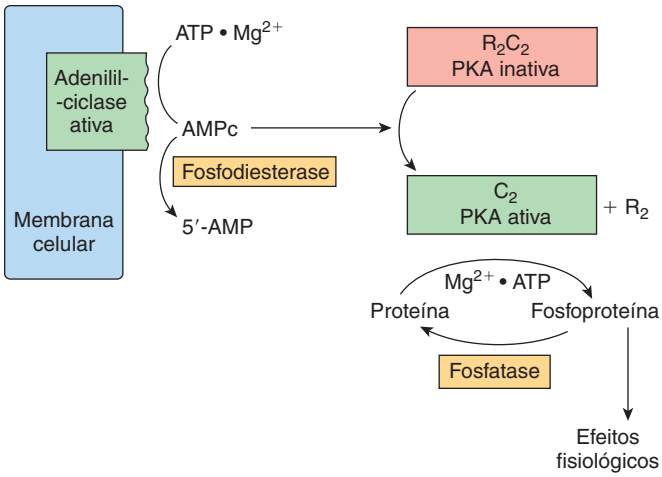


FIGURA 42-5 Regulação hormonal dos processos celulares por meio da proteinoquinase dependente de AMPc (PKA). A PKA existe em uma forma inativa, como um heterotetrâmero R_2C_2, constituído de duas subunidades reguladoras (R) e duas subunidades catalíticas (C). O AMPc gerado pela ação da adenilil-ciclase (ativada conforme ilustrado na Figura 42-4) liga-se à subunidade reguladora da PKA. Isso resulta em dissociação das subunidades reguladoras e catalíticas e em ativação dessas últimas. As subunidades catalíticas ativas fosforilam diversas proteínas-alvo nos resíduos de serina e treonina. As fosfatases removem o fosfato desses resíduos e, portanto, interrompem a resposta fisiológica. Uma fosfodiesterase também pode interromper a resposta ao converter o AMPc em 5′-AMP.

quinase A), e atuam como estruturas que localizam a PKA próxima a substratos, focalizando, assim, a atividade da PKA para substratos fisiológicos e facilitando a regulação biológica espaço-temporal, enquanto permitem também que proteínas compartilhadas comuns induzam respostas fisiológicas específicas. Foram descritas múltiplas AKAPs; essas proteínas podem ligar-se à PKA e a outras quinases, bem como a fosfatases, fosfodiesterases (que hidrolisam o AMPc) e substratos de proteinoquinases.

Fosfoproteínas

Acredita-se que todos os efeitos do AMPc nas células eucarióticas sejam mediados pela fosforilação-desfosforilação das proteínas, principalmente nos resíduos de serina e de treonina. O controle de qualquer um dos efeitos do AMPc, inclusive processos tão diversos como a esteroidogênese, a secreção, transporte de íons, o metabolismo dos carboidratos e das gorduras, a indução enzimática, a regulação dos genes, a transmissão sináptica e o crescimento e a replicação celulares pode ser conferido por uma proteinocinase específica, por uma fosfatase específica ou por substratos específicos para fosforilação. Esses substratos ajudam a definir um tecido-alvo e estão envolvidos na definição da extensão de determinada resposta dentro de uma célula específica. Por exemplo, os efeitos do AMPc sobre a transcrição dos genes são mediados **pela proteína de ligação do elemento de resposta ao AMP cíclico** (**CREB**). A CREB liga-se a um elemento de resposta ao AMPc (CRE) (ver Tabela 42-1) no seu estado não fosforilado e atua como ativador fraco da transcrição. Quando fosforilada pela PKA, a CREB liga-se ao coativador **proteína de ligação da CREB CBP/p300** (ver adiante) e, por isso, atua como ativador muito mais potente da transcrição. A CBP e p300 relacionada contêm atividade de histona acetiltransferase e, portanto, atuam como correguladores da transcrição ativos na cromatina (Capítulos 36, 38). É interessante assinalar que a CBP/p300 também pode acetilar determinados fatores da transcrição, estimulando, assim, a sua capacidade de ligar-se ao DNA e modular a transcrição.

Fosfodiesterases

As ações produzidas pelos hormônios que aumentam a concentração de AMPc podem ser interrompidas de diversas maneiras, inclusive a hidrólise do AMPc em 5′-AMP por fosfodiesterases (ver Figura 42-5). A presença dessas enzimas hidrolíticas assegura uma rápida renovação do sinal (AMPc) e, portanto, uma rápida interrupção do processo biológico uma vez removido o estímulo hormonal. Existem pelo menos 11 membros conhecidos da família de enzimas das fosfodiesterases. Essas enzimas estão sujeitas à regulação pelos seus substratos, o AMPc e o GMPc; por hormônios; e por mensageiros intracelulares, como o cálcio, que provavelmente atua por meio da calmodulina. Os inibidores da fosfodiesterase, mais notavelmente os derivados da xantina metilados, como a cafeína, aumentam o AMPc intracelular e simulam ou prolongam as ações dos hormônios por meio desse sinal.

Fosfoproteína fosfatases

Tendo em vista a importância da fosforilação proteica, não é surpreendente que a regulação da reação de desfosforilação proteica constitua outro mecanismo de controle importante (ver Figura 42-5). As próprias fosfoproteínas fosfatases estão sujeitas à regulação por reações de fosforilação-desfosforilação e por uma variedade de outros mecanismos, como interações entre as proteínas. Com efeito, as especificidades de substrato das fosfosserina-fosfotreonina fosfatases podem ser determinadas por subunidades reguladoras distintas, cuja ligação é regulada por ação hormonal. Um dos papéis mais bem estudados da regulação pela desfosforilação de proteínas é o metabolismo do glicogênio no músculo. Foram descritos dois tipos principais de fosfosserina-fosfotreonina fosfatases. O tipo I desfosforila preferencialmente a subunidade β da fosforilase quinase, enquanto o tipo II desfosforila a subunidade α. A fosfatase tipo I está implicada na regulação da glicogênio sintase, da fosforilase e da fosforilase quinase. Essa própria fosfatase é regulada pela fosforilação de algumas de suas subunidades, e essas reações são revertidas pela ação de uma das fosfatases tipo II. Além disso, dois inibidores proteicos termoestáveis regulam a atividade da fosfatase tipo I. O inibidor-1 é fosforilado e ativado por proteinoquinases dependentes de AMPc, enquanto o inibidor-2, que pode ser uma subunidade da fosfatase ativa, também é fosforilado, possivelmente pela glicogênio sintase cinase-3. As fosfatases que atacam a fosfotirosina também são importantes na transdução de sinais (ver Figura 42-8).

O GMPc também é um sinal intracelular

O GMP cíclico é gerado a partir do GTP pela enzima guanilil ciclase, que ocorre nas formas solúvel e ligada à membrana. Cada uma dessas isoenzimas tem propriedades fisiológicas singulares. As atriopeptinas, uma família de peptídeos produzidos nos tecidos atriais cardíacos, causam natriurese, diurese, vasodilatação e inibição da secreção de aldosterona. Esses peptídeos (p. ex., o

fator natriurético atrial) ligam-se à forma da guanilil ciclase ligada à membrana, ativando-a. Esse processo resulta em aumento do nível de GMPc em até 50 vezes em alguns casos, e acredita-se que isso possa mediar os efeitos descritos anteriormente. Outras evidências relacionam o GMPc com a vasodilatação. Diversos compostos, como o nitroprussiato, a nitroglicerina, o óxido nítrico, o nitrito de sódio e a azida sódica, provocam relaxamento da musculatura lisa e são potentes vasodilatadores. Esses agentes aumentam o GMPc pela ativação da forma solúvel da guanilil ciclase, e os inibidores da GMPc fosfodiesterase (o fármaco sildenafila [Viagra], por exemplo), aumentam e prolongam essas respostas. Os níveis aumentados de GMPc ativam a proteinoquinase dependente de GMPc (PKG), a qual, por sua vez, fosforila diversas proteínas do músculo liso. Presumivelmente, esse mecanismo está envolvido no relaxamento da musculatura lisa e na vasodilatação.

Vários hormônios atuam por meio do cálcio ou dos fosfatidilinositóis

O cálcio ionizado é um importante regulador de uma variedade de processos celulares, como a contração muscular, o acoplamento estímulo-secreção, a cascata da coagulação sanguínea, a atividade enzimática e a excitabilidade da membrana. Além disso, atua como mensageiro intracelular da ação hormonal.

Metabolismo do cálcio

A concentração extracelular de cálcio (Ca^{2+}) é de ~ 5 mmol/L e está sujeita a um controle muito rígido. Embora quantidades substanciais de cálcio estejam associadas às organelas intracelulares, como as mitocôndrias e o retículo endoplasmático, a concentração intracelular de cálcio livre ou ionizado (Ca^{2+}) é muito baixa: 0,05 a 10 μmol/L. Apesar desse gradiente de concentração significativo e de um gradiente elétrico transmembrana favorável, a entrada do Ca^{2+} na célula é restrito. Uma quantidade significativa de energia é consumida para assegurar o controle do Ca^{2+} intracelular, visto que a elevação prolongada do Ca^{2+} dentro da célula é muito tóxica. Um mecanismo de troca de Na^{+}/Ca^{2+}, que possui alta capacidade, porém baixa afinidade, bombeia o Ca^{2+} para fora das células. Existe também uma bomba de Ca^{2+}/prótons dependente de ATPase, que expulsa o Ca^{2+} em troca de H^{+}. Esse sistema exibe alta afinidade pelo Ca^{2+}, porém baixa capacidade e, provavelmente, é responsável pelo ajuste fino do Ca^{2+} no citosol. Além disso, as Ca^{2+}-ATPases bombeiam o Ca^{2+} do citosol para o lúmen do retículo endoplasmático. Existem três maneiras de alterar o Ca^{2+} citosólico: (1) determinados hormônios (da classe II.C, Tabela 41-3), por meio de sua ligação a receptores que são, eles próprios, canais de Ca^{2+}, aumentam a permeabilidade da membrana ao Ca^{2+} e, por conseguinte, aumentam o seu influxo. (2) Os hormônios também promovem indiretamente o influxo do Ca^{2+} ao modular o potencial de membrana na membrana plasmática. A despolarização da membrana abre os canais de Ca^{2+} regulados por voltagem e possibilita o influxo do Ca^{2+}. (3) O Ca^{2+} pode ser mobilizado do retículo endoplasmático e, possivelmente, das reservas mitocondriais.

Uma observação importante que relaciona o Ca^{2+} com a ação hormonal envolveu a definição dos alvos intracelulares de ação do Ca^{2+}. A descoberta de um regulador da atividade das fosfodiesterases dependente de Ca^{2+} forneceu a base para uma ampla compreensão do processo de interação do Ca^{2+} e do AMPc dentro das células.

Calmodulina

A proteína reguladora dependente de cálcio é a calmodulina, uma proteína de 17-kDa, que é homóloga na sua estrutura e função à proteína muscular troponina C. A calmodulina possui quatro sítios de ligação do Ca^{2+}, e a ocupação integral desses sítios leva a uma acentuada alteração de conformação, que permite à calmodulina ativar enzimas e canais iônicos. A interação do Ca^{2+} com a calmodulina (com consequente alteração da atividade desta última) assemelha-se, do ponto de vista conceitual, à ligação do Ca^{2+} à PKA e à ativação subsequente dessa molécula. A calmodulina pode ser uma das numerosas subunidades de proteínas complexas e está particularmente envolvida na regulação de várias quinases e enzimas da geração e degradação de nucleotídeos cíclicos. A **Tabela 42-4** fornece uma lista parcial das enzimas reguladas direta ou indiretamente pelo Ca^{2+}, provavelmente por meio da calmodulina.

Além de seus efeitos sobre as enzimas e o transporte de íons, o Ca^{2+}/calmodulina regula a atividade de muitos elementos estruturais das células. Isso inclui o complexo de actina-miosina do músculo liso, que está sob controle β-adrenérgico, bem como vários processos mediados por microfilamentos nas células não contráteis, incluindo motilidade celular, alterações da conformação da célula, mitose, liberação de grânulos e endocitose.

O cálcio é um mediador da ação hormonal

O papel do Ca^{2+} na ação hormonal é sugerido pelas observações de que o efeito de muitos hormônios é (1) atenuado por meios desprovidos de Ca^{2+}, ou quando há depleção do cálcio intracelular; (2) simulado por agentes que aumentam o Ca^{2+} citosólico, como o ionóforo de A23187; (3) influenciar o fluxo de cálcio celular. A regulação do metabolismo do glicogênio no fígado pelas vasopressinas e pelas catecolaminas β-adrenérgicas fornece um bom exemplo. Isso está ilustrado de modo esquemático nas Figuras 19-6 e 19-7.

TABELA 42-4 Enzimas e proteínas reguladas pelo cálcio ou pela calmodulina

• Adenilil-ciclase
• Proteinoquinases dependentes de Ca^{2+}
• Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase
• Proteinoquinase dependente de Ca^{2+}-fosfolipídeo
• Nucleotídeo cíclico fosfodiesterase
• Algumas proteínas do citoesqueleto
• Alguns canais iônicos (p. ex., canais de cálcio do tipo L)
• Óxido nítrico sintase
• Fosforilase cinase
• Fosfoproteína fosfatase 2B
• Alguns receptores (p. ex., receptor de glutamato tipo NMDA)

Diversas enzimas metabólicas críticas são reguladas pelo Ca^{2+}, pela fosforilação ou por ambos, incluindo a glicogênio sintase, a piruvato-quinase, a piruvato-carboxilase, a glicerol-3-fosfato desidrogenase e a piruvato-desidrogenase.

O metabolismo dos fosfatidilinositídeos afeta a ação hormonal dependente de Ca^{2+}

Algum sinal precisa estabelecer uma comunicação entre o receptor hormonal na membrana plasmática e os reservatórios de Ca^{2+} intracelular. Essa função é desempenhada pelos produtos do metabolismo dos fosfatidilinositóis. Os receptores de superfície celular, como os receptores de acetilcolina, do hormônio antidiurético e das catecolaminas tipo α_1, quando ocupados pelos seus respectivos ligantes, atuam como potentes ativadores da fosfolipase C. A ligação do receptor e a ativação da fosfolipase C são acopladas pelas isoformas da G_q (Tabela 42-3 e **Figura 42-6**). A fosfolipase C catalisa a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato em inositol trifosfato (IP_3) e 1,2-diacilglicerol (**Figura 42-7**).

O próprio diacilglicerol é capaz de ativar a **proteinoquinase C** (**PKC**), cuja atividade também depende do Ca^{2+}. Ao interagir com um receptor intracelular específico, o IP_3 atua como liberador efetivo do Ca^{2+} dos locais de reserva intracelulares no retículo endoplasmático. Deste modo, a hidrólise do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato leva à ativação da PKC e promove um aumento do Ca^{2+} citoplasmático. Conforme ilustrado na Figura 42-4, a ativação das proteínas G também pode exercer uma ação direta sobre os canais de Ca^{2+}. A consequente elevação do Ca^{2+} citosólico ativa quinases dependentes de Ca^{2+}- calmodulina e muitas outras enzimas também dependentes de Ca^{2+}-calmodulina.

Os agentes esteroidogênicos – incluindo ACTH e AMPc no córtex suprarrenal; a angiotensina II, o K^+, a serotonina, o ACTH e o AMPc na zona glomerulosa da suprarrenal; o LH no ovário; e o LH e AMPc nas células de Leydig dos testículos – têm sido associados a níveis aumentados de ácido fosfatídico, fosfatidilinositol e polifosfoinositídeos (ver Capítulo 15) nos respectivos tecidos-alvo. Vários outros exemplos poderiam ser citados.

A Figura 42-6 mostra os papéis que o Ca^{2+} e os produtos de degradação dos polifosfoinositídeos podem desempenhar na ação hormonal. Nesse esquema, a proteinoquinase C ativada pode fosforilar substratos específicos que, em seguida, alteram os processos fisiológicos. De modo semelhante, o processo Ca^{2+}

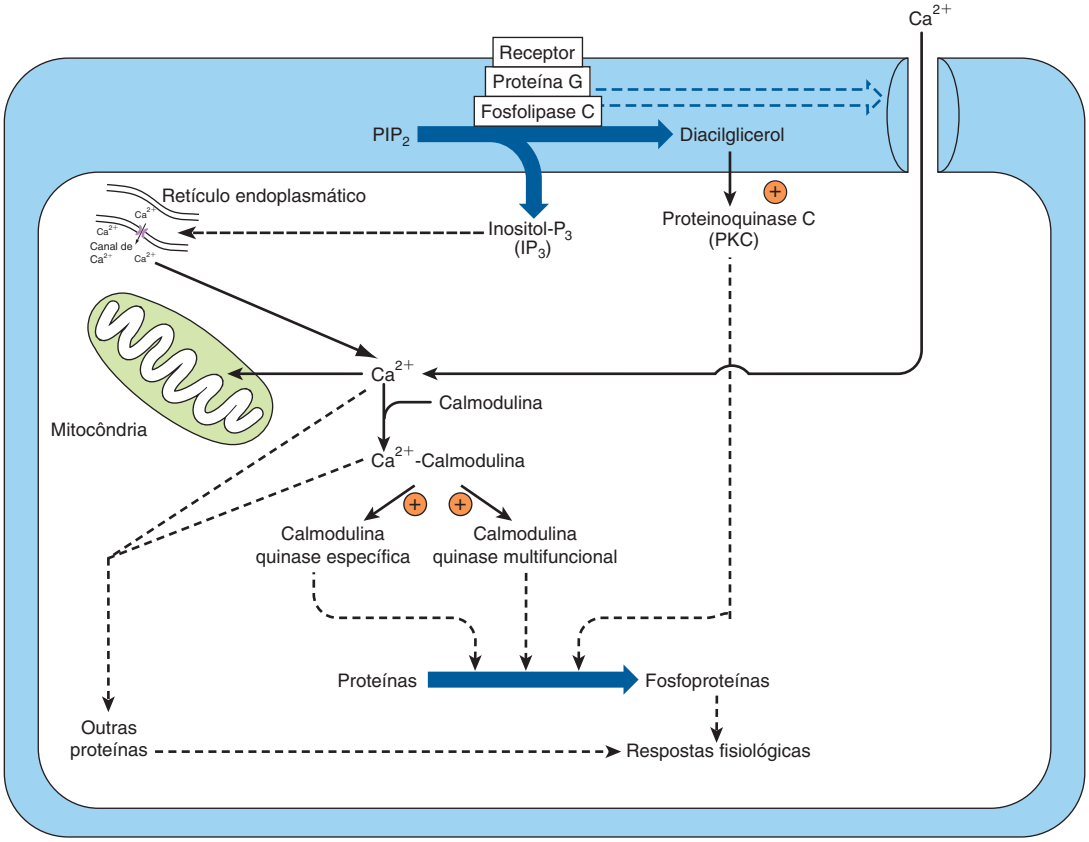


FIGURA 42-6 Algumas interações entre hormônio e receptor resultam na ativação da fosfolipase C (PLC). A ativação da PLC parece envolver uma proteína G específica, que também pode ativar um canal de cálcio. A fosfolipase C gera inositol trifosfato (IP_3), que libera o Ca^{2+} intracelular armazenado, e diacilglicerol (DAG), um potente ativador da proteinoquinase C (PKC). Nesse esquema, a PKC ativada fosforila substratos específicos, que, em seguida, alteram processos fisiológicos. De modo semelhante, o complexo calmodulina pode ativar quinases específicas, das quais duas estão ilustradas aqui. Essas ações resultam na fosforilação dos substratos, levando a uma alteração das respostas fisiológicas. Esta figura também mostra que o Ca^{2+} pode entrar nas células pelos canais de Ca^{2+} regulados por voltagem ou por ligantes. O Ca^{2+} intracelular também é regulado pelo armazenamento e liberação desse íon das mitocôndrias e do retículo endoplasmático. (Cortesia de JH Exton.)

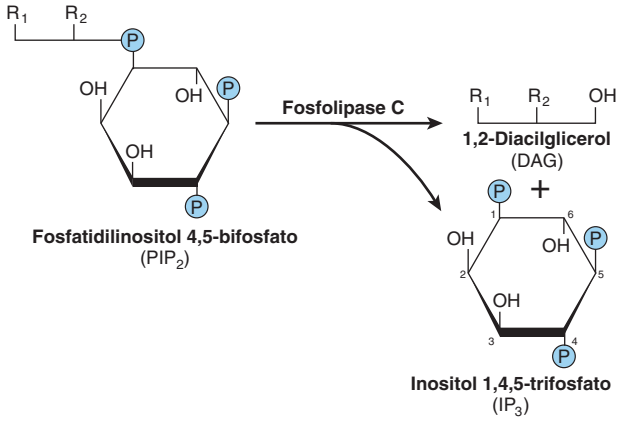


FIGURA 42-7 A fosfolipase C cliva o PIP_2 em diacilglicerol e inositol trifosfato. Em geral, R_1 é estearato, e R_2 é habitualmente araquidonato. O IP_3 pode ser desfosforilado (em I-1,4-P_2 inativo) ou fosforilado (em I-1,3,4,5-P_4 potencialmente ativo).

calmodulina pode ativar quinases específicas. Em seguida, essas quinases modificam os substratos e, consequentemente, alteram as respostas fisiológicas.

Alguns hormônios atuam por meio de uma cascata de proteinoquinases

As proteinoquinases individuais, como a PKA, a PKC e as Ca^{2+}-calmodulina (CaM)-quinases, que levam à fosforilação dos resíduos de serina e de treonina nas proteínas-alvo, desempenham um papel muito importante na ação hormonal. A descoberta de que o receptor do EGF contém atividade intrínseca de tirosina-quinase, a qual é ativada pela ligação do ligante EGF, representou um importante avanço. Os receptores de insulina e do IGF-I também exibem atividade intrínseca de tirosina-quinase ativada por ligantes. Vários receptores – geralmente aqueles envolvidos na ligação de ligantes relacionados com o controle do crescimento, a diferenciação e a resposta inflamatória – apresentam atividade intrínseca de tirosina-quinase ou estão associados a proteínas que são tirosina-quinase. Outro aspecto de diferenciação dessa classe de ação hormonal consiste no fato de que essas quinases fosforilam preferencialmente os resíduos de tirosina, e a fosforilação da tirosina não é frequente (< 0,03% da fosforilação total dos aminoácidos) nas células dos mamíferos. Uma terceira característica diferenciadora é que a interação ligante-receptor, que resulta em fosforilação da tirosina, desencadeia uma cascata que pode envolver várias proteinoquinases, fosfatases e outras proteínas reguladoras.

A insulina transmite sinais por várias cascatas de quinases

Os receptores de insulina, do fator de crescimento epidérmico (EGF) e do IGF-I possuem atividades intrínsecas de proteína tirosina-quinase localizadas em seus domínios citoplasmáticos. Essas atividades são estimuladas quando os ligantes ligam-se a seus respectivos receptores. Em seguida, os receptores são autofosforilados nos resíduos de tirosina, o que desencadeia uma complexa série de eventos (resumidos, de modo simplificado, na **Figura 42-8**). A seguir, o receptor fosforilado de insulina fosforila os substratos desse receptor (existem pelo menos quatro dessas moléculas, denominadas IRS 1 a 4) nos resíduos de tirosina. O IRS fosforilado liga-se aos domínios 2 homologia Src (SH2) de uma variedade de proteínas que estão diretamente envolvidas na mediação dos diferentes efeitos da insulina. Uma dessas proteínas, a PI-3 quinase, acopla a ativação do receptor de insulina com a ação do hormônio por meio da ativação de várias moléculas, incluindo a quinase PDK1 (quinase 1 dependente de fosfoinositídeo). Essa enzima propaga o sinal por meio de várias outras quinases, incluindo a PKB (também conhecida como AKT), a SKG e a aPKC (ver legenda da Figura 42-8 para definições e abreviaturas ampliadas). Uma via alternativa distal à PDK1 envolve a p70S6K e, talvez, outras quinases ainda não identificadas.Uma segunda via importante inclui o mTOR. Essa enzima é regulada diretamente pelos níveis de aminoácidos e pela insulina e é essencial para a atividade da p70S6K. Essa via assegura uma distinção entre os ramos de PKB e p70S6K distais à PKD1. Essas vias estão envolvidas na translocação das proteínas, na atividade enzimática e na regulação, pela insulina, dos genes envolvidos no metabolismo (Figura 42-8). Outra proteína que contém o domínio SH2 é a GRB2 que se liga ao IRS-1 e acopla a fosforilação da tirosina com várias proteínas, resultando na ativação de uma cascata de treonina e serina quinases. A Figura 42-8 ilustra uma via pela qual essa interação insulina-receptor ativa a via da proteinoquinase ativada por mitógeno (MAP) e os efeitos anabólicos do hormônio. Os papéis exatos desempenhados por muitas dessas proteínas de ancoragem, quinases e fosfatases ainda não foram estabelecidos.

A via Jak/STAT é utilizada por hormônios e citocinas

A ativação das tirosina-quinases também pode iniciar uma cascata de fosforilação e desfosforilação, que envolve a ação de várias outras proteinoquinases e ações compensatórias de fosfatases. Dois mecanismos são utilizados para iniciar essa cascata. Alguns hormônios, como o hormônio do crescimento, a prolactina, a eritropoietina e as citocinas, iniciam a sua ação com a ativação de uma tirosina-quinase, porém essa atividade não constitui parte integral do receptor hormonal. A interação hormônio-receptor promove a ligação e a ativação das **proteínas citoplasmáticas tirosina-quinases** tais como **Tyk-2, Jak1** ou **Jak2**.

Essas quinases fosforilam uma ou mais proteínas citoplasmáticas que, em seguida, associam-se a outras proteínas de ancoragem por meio da ligação aos domínios SH2. Esse tipo de interação resulta na ativação de uma família de proteínas citosólicas, denominadas **transdutores de sinais e ativadores da transcrição** (**STAT**). A proteína STAT fosforilada forma dímeros e é transferida para o núcleo, liga-se a um elemento específico do DNA, como o elemento de resposta à interferon (IRE) e ativa a transcrição. Esse processo está ilustrado na **Figura 42-9**. Outros eventos de ancoragem ao SH2 podem levar à ativação da PI-3-quinase, da via da MAP quinase (por meio de SHC ou GRB2) ou à ativação mediada pela proteína G da fosfolipase C (PLCγ) com consequente produção de diacilglicerol e ativação da proteinoquinase C. É evidente que existe a possibilidade de "comunicação cruzada" quando diferentes hormônios ativam essas várias vias de transdução de sinais.

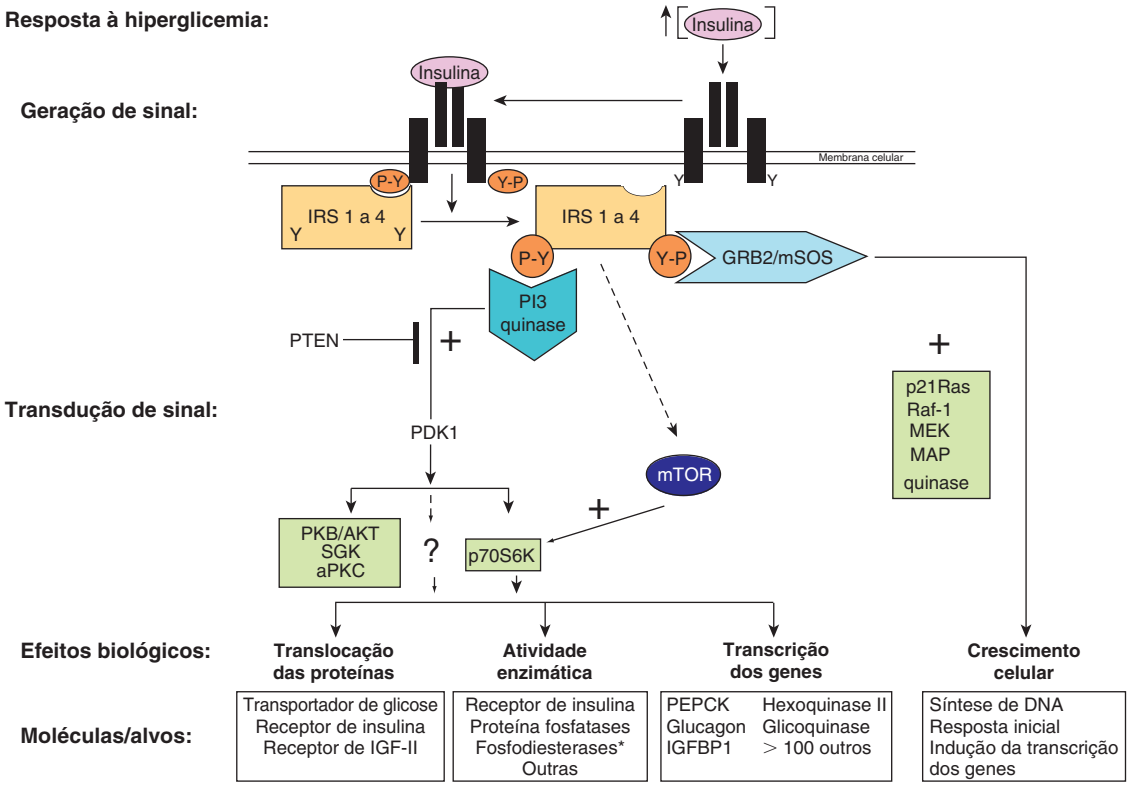


FIGURA 42-8 Vias de sinalização da insulina. As vias de sinalização da insulina fornecem um excelente exemplo do paradigma de "reconhecimento → liberação de hormônio → geração de sinal → efeitos" esquematizado na Figura 42-1. A insulina é liberada na corrente sanguínea pelas células β do pâncreas em resposta à hiperglicemia. A liberação da insulina a um receptor de insulina (IR) heterotetramérico da membrana plasmática, específico da célula-alvo, resulta em uma cascata de eventos intracelulares. Em primeiro lugar, a atividade intrínseca de tirosina-quinase do receptor de insulina é ativada e assinala o evento inicial. A ativação do receptor resulta em aumento da fosforilação da tirosina (conversão de resíduos Y específicos → Y-P dentro do receptor). Em seguida, uma ou mais das moléculas do substrato do receptor de insulina (IRS) (IRS 1 a 4) ligam-se ao receptor com tirosina fosforilada e são elas próprias que possuem a tirosina especificamente fosforilada. As proteínas IRS interagem com o IR ativado por meio dos domínios de PH (homologia da plecstrina) N-terminal e de PTB (ligação fosfotirosina). As proteínas IRS ancoradas ao IR são fosforiladas na tirosina, e os resíduos P-Y resultantes formam o sítio de ancoragem para várias outras proteínas de sinalização (ou seja, PI-3 quinase, GRB2 e mTOR). A GRB2 e a PI3K ligam-se a resíduos das moléculas de IRS por meio de seus domínios SH (homologia *Src*). A ligação aos resíduos IRS-Y-P das moléculas de IRS leva à ativação da atividade de muitas proteínas de sinalização intracelulares, como GTPases, proteinoquinase e lipídeo-quinases, que desempenham papéis essenciais em determinadas ações metabólicas da insulina. A figura mostra as duas vias mais bem descritas. De forma detalhada, a fosforilação de uma molécula de IRS (provavelmente IRS-2) resulta em ancoragem e ativação da lipídeo-quinase, a PI-3; a PI-3K gera novos lipídeos de inositol, que atuam como moléculas de "mensageiro secundário". Por sua vez, essas moléculas ativam a PDK1 e, em seguida, uma variedade de moléculas de sinalização distais, incluindo a proteinoquinase B (PKB/AKT), SGK e a aPKC. Uma via alternativa envolve a ativação da p70S6K e, talvez, de outras quinases ainda não identificadas. Em seguida, a fosforilação da molécula de IRS (provavelmente IRS-1) resulta em ancoragem de GRB2/mSOS de ativação da GTPase pequena, p21Ras, que inicia uma cascata de proteinoquinase, que ativa as isoformas Raf-1, MEK, e p42/p44 MAP quinases. Essas proteínas quinases são importantes na regulação da proliferação e diferenciação de muitos tipos celulares. A via do mTOR fornece uma maneira alternativa de ativar a p70S6K e parece estar envolvida na sinalização de nutrientes, bem como na ação da insulina. Como mostra a figura, cada uma dessas cascatas podem influenciar diferentes processos fisiológicos. Todos os eventos de fosforilação são reversíveis por meio da ação de fosfatases específicas. Por exemplo, a lipídeo fosfatase PTEN desfosforila o produto da reação da PI-3 quinase, antagonizando, assim, a via e interrompendo o sinal. Os efeitos representativos das principais ações da insulina estão apresentados em cada um dos retângulos. O asterisco depois da fosfodiesterase indica que a insulina afeta indiretamente a afinidade de muitas enzimas por ativação das fosfodiesterases e redução dos níveis de AMPc. (aPKC, proteinoquinase C atípica; GRB2, proteína de ligação do fator de crescimento 2; IGFBP, proteína de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina; IRS 1 a 4, isoformas do substrato do receptor de insulina 1 a 4; MAP quinase, proteinoquinase ativada por mitógeno; MEK, MAP quinase-quinase e ERK quinase; mSOS, *mammalian son of sevenless*; mTOR, alvo da rapamicina dos mamíferos; p70S6K, proteinoquinase S6 do ribossomo p70; PDK1, quinase dependente de fosfoinositídeo; PI-3 quinase, fosfatidilinositol-3-quinase; PKB, proteinoquinase B; PTEN, fosfatase e homólogo da tensina deletada no cromossomo 10; SGK, quinase sérica e regulada por glicocorticoides.)

A via do NF-κB é regulada pelos glicocorticoides

O fator de transcrição **NF-κβ** é um **complexo heterodimérico**, geralmente composto de duas **subunidades denominadas p50 e p65** (**Figura 42-10**). Normalmente, o NF-κβ é mantido sequestrado no citoplasma em uma forma transcricionalmente inativa por membros da **família de Inibidores do NF-κβ** (**IκB**). Estí-

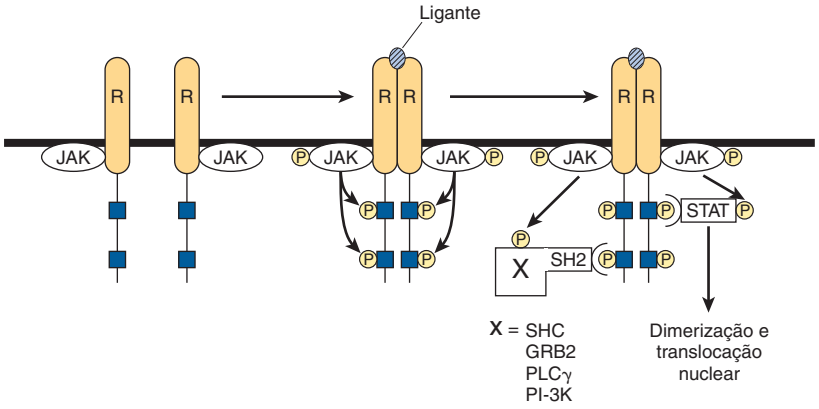


FIGURA 42-9 Iniciação da transdução de sinais por receptores ligados às JaK quinases. Os receptores (R) que se ligam à prolactina, ao hormônio do crescimento, aos interferons e às citocinas carecem de tirosina-quinase endógena. Com a ligação dos ligantes, esses receptores sofrem dimerização, e uma proteína associada (JaK1, Jak2 ou TYK) é fosforilada. A JaK-P, uma quinase ativa, fosforila o receptor nos resíduos de tirosina. As proteínas STAT associam-se ao receptor fosforilado e, em seguida, elas próprias são fosforiladas pela Jak-P. A proteína STAT fosforilada, STATP, sofre dimerização, é transferida para o núcleo, liga-se a elementos específicos do DNA e regula a transcrição. Os resíduos de fosfotirosina do receptor ligam-se também a várias proteínas contendo o domínio SH2 (X-SH2). Isso resulta em ativação da via da MAP-quinase (por meio da SHC ou GRB2), da PLCγ ou da PI-3 quinase.

mulos extracelulares, como as citocinas pró-inflamatórias, as espécies reativas de oxigênio e os mitógenos, levam à ativação do complexo IκB quinase, IKK, que é uma estrutura hétero-hexamérica, constituída pelas subunidades α, β e γ. O IKK fosforila o IκB em dois resíduos de serina, o que direciona o IκB para ubiquitinação e degradação subsequente pelo proteassomo. Após a degradação do IκB, o NF-κB livre é transferido ao núcleo, onde se liga a vários promotores de genes e ativa a transcrição, particularmente de genes envolvidos na **resposta inflamatória.** A regulação transcricional do NF-κB é mediada por uma variedade de coativadores, como a proteína de ligação da CREB (CBP), conforme descrito adiante (ver Figura 42-13).

Os **hormônios glicocorticoides** são agentes terapeuticamente úteis no tratamento de uma variedade de doenças inflamatórias e imunes. Suas ações anti-inflamatórias e imunomoduladoras são explicadas, em parte, pela inibição do NF-κB e suas ações subsequentes. Foram apresentadas evidências de três mecanismos para a inibição do NF-κB pelos glicocorticoides: (1) os glicocorticoides aumentam o mRNA do IκB, resultando em aumento da proteína e sequestro mais eficiente do IκB no citoplasma. (2) O receptor de glicocorticoides compete com o NF-κB pela ligação a coativadores. (3) O receptor de glicocorticoides liga-se diretamente à subunidade p65 do NF-κB e inibe a sua ativação (Figura 42-10).

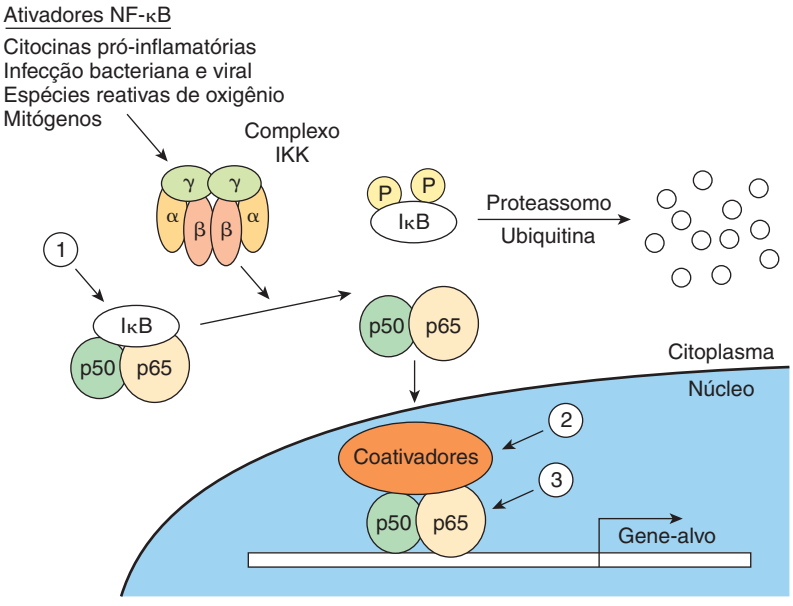


FIGURA 42-10 Regulação da via do NF-κB. O NF-κB consiste em duas subunidades, p50 e p65, que, quando presentes no núcleo, regulam a transcrição de grande quantidade de genes importantes para a resposta inflamatória. O NF-κB é impedido de entrar no núcleo pelo IκB, um inibidor do NF-κB. O IκB liga-se ao sinal de localização nuclear do NF-κB – e o mascara. Essa proteína citoplasmática é fosforilada por um complexo IKK, que é ativado por citocinas, espécies reativas de oxigênio e mitógenos. O IκB fosforilado pode ser ubiquitinilado e degradado, com consequente liberação do NF-κB. Acredita-se que os glicocorticoides, que são agentes anti-inflamatórios potentes, afetam pelo menos três etapas nesse processo (1, 2, 3), conforme descrito no texto.

OS HORMÔNIOS PODEM INFLUENCIAR EFEITOS BIOLÓGICOS ESPECÍFICOS PELA MODULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO

Os sinais gerados, conforme descrito anteriormente, precisam ser traduzidos em uma ação que permita à célula adaptar-se de modo efetivo a um estímulo (Figura 42-1). Grande parte dessa adaptação é obtida por meio de alterações nas taxas de transcrição de genes específicos. Muitas observações diferentes levaram ao atual conceito para explicar como os hormônios afetam a transcrição. Algumas dessas observações são as seguintes: (1) os genes transcritos ativamente encontram-se em regiões de cromatina "abertas" (experimentalmente definida como suscetibilidade relativa à enzima DNase I), que possibilita o acesso dos fatores de transcrição ao DNA. (2) Os genes apresentam regiões reguladoras, e os fatores de transcrição ligam-se a essas regiões para modular a frequência da iniciação da transcrição. (3) O complexo hormônio-receptor pode constituir um desses fatores de transcrição. A sequência do DNA à qual o complexo se liga é denominada HRE (ver exemplos na Tabela 41-2). (4) Como alternativa, outros sinais gerados por hormônios podem modificar a localização, a quantidade ou a atividade dos fatores de transcrição e, assim, influenciar a ligação ao elemento regulador ou de resposta. (5) Os membros de uma grande superfamília de receptores nucleares atuam com os receptores hormonais descritos anteriormente – ou de modo análogo. (6) Esses receptores nucleares interagem com outro grande grupo de moléculas correguladoras para produzir alterações na transcrição de genes específicos.

Foram definidos vários HREs

Os HREs assemelham-se a elementos intensificadores, já que não são estritamente dependentes da posição ou da localização ou orientação. Em geral, esses elementos são encontrados a uma distância de algumas centenas de nucleotídeos proximais (5′) ao sítio de iniciação da transcrição; entretanto, podem estar localizados dentro da região de codificação do gene, em íntrons. Os HREs foram definidos pela estratégia ilustrada na Figura 38-11. As sequências de consenso ilustradas na Tabela 42-1 foram deduzidas por meio da análise de numerosos genes regulados por determinado hormônio, utilizando sistemas simples de repórteres heterólogos (ver Figura 38-10). Embora esses HRE simples se liguem ao complexo hormônio-receptor com mais afinidade do que ao DNA circundante – ou ao DNA de uma fonte não relacionada – e confiram uma responsividade hormonal ao gene repórter, ficou logo evidente que o circuito regulador dos genes naturais deve ser muito mais complicado. Os glicocorticoides, as progestinas, os mineralocorticoides e os androgênios exercem ações fisiológicas amplamente diferentes. Como a especificidade exigida para esses efeitos poderia ser conseguida pela regulação da expressão dos genes pelo mesmo HRE (Tabela 42-1)? Perguntas como esta levaram a experimentos que possibilitaram a elaboração de um modelo muito complexo da liberação da transcrição. Por exemplo, o HRE precisa estar associado a outros elementos do DNA (e a proteínas de ligação associadas) para a sua função ótima. A extensa semelhança de sequência observada entre os receptores dos hormônios esteroides, particularmente em seus domínios de ligação do DNA (DBD), levou à descoberta da **superfamília de receptores nucleares** de proteínas. Essas proteínas – bem como um grande número de **proteínas correguladoras** – possibilitam uma ampla variedade de interações entre o DNA e a proteína e entre proteínas, bem como a especificidade necessária para o controle fisiológico altamente regulado. A **Figura 42-11** ilustra um esquema desse tipo de montagem.

Existe uma grande família de proteínas receptoras nucleares

A superfamília de receptores nucleares consiste em um conjunto diverso de fatores da transcrição, que foram descobertos em virtude de uma semelhança de sequência em seus DBD. Essa família, atualmente com > 50 membros, inclui os receptores hormonais nucleares discutidos anteriormente, vários outros receptores cujos ligantes foram descobertos após a identificação dos receptores, e muitos receptores supostos ou órfãos, para os quais ainda não foi descoberto um ligante.

Esses receptores nucleares apresentam várias características estruturais comuns (**Figura 42-12**). Todos possuem um DBD de

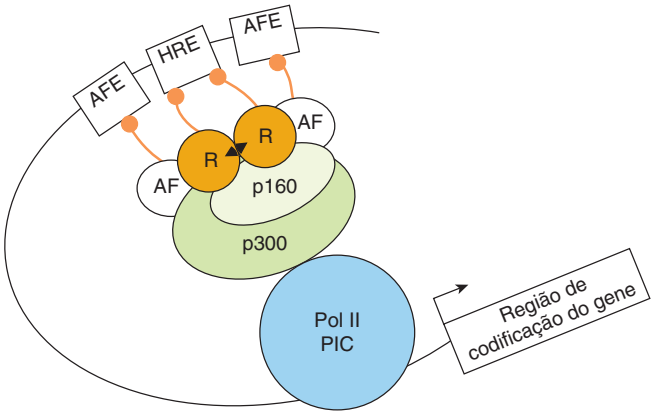


FIGURA 42-11 A unidade de transcrição da resposta hormonal. A unidade de transcrição da resposta hormonal é uma montagem de elementos do DNA que liga proteínas de ligação que interagem, por meio de interações entre proteínas, com diversas moléculas coativadoras ou correpressoras. Um componente essencial é o elemento de resposta hormonal que se liga ao receptor (R) ligado ao ligante (▲). Os elementos de fatores acessórios (AFE) com os fatores de transcrição ligados também são importantes. Mais de vinte desses fatores acessórios (AF), que são frequentemente membros da superfamília dos receptores nucleares, foram associados aos efeitos dos hormônios sobre a transcrição. Os AF podem interagir entre si, com os receptores nucleares ocupados por ligantes ou com correguladores. Esses componentes comunicam-se com a maquinaria de transmissão basal, formando a Polimerase II PIC (isto é, RNAP II e GTFs) por meio de um complexo corregulador, que pode consistir em um ou mais membros das famílias de p160, correpressor, relacionada com mediadores ou das famílias CBP/p300 (ver Tabela 42-6). Convém lembrar (Capítulos 36,38) que muitos dos correguladores da transcrição transportam atividades enzimáticas intrínsecas que modificam de modo covalente o DNA, as proteínas de transcrição e as histonas presentes nos nucleossomos (não ilustrado aqui) dentro ou a redor do intensificador (HRE, AFE) e promotor. Coletivamente, o hormônio, o receptor hormonal, a cromatina, o DNA e o mecanismo de transcrição integram e processam os sinais hormonais para regular fisiologicamente a transcrição.

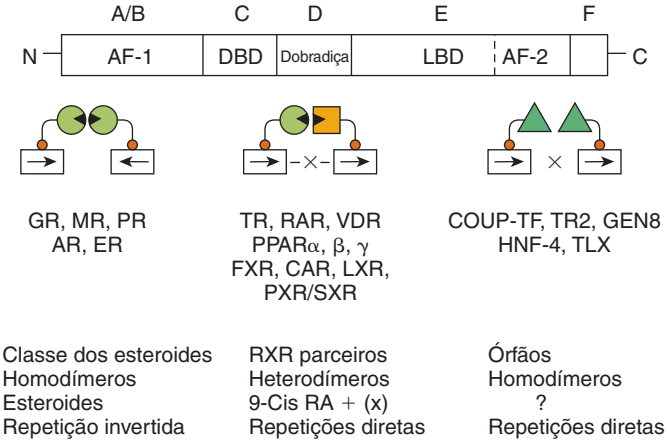


FIGURA 42-12 A superfamília de receptores nucleares. Os membros dessa família são divididos em seis domínios estruturais (A a F). O domínio A/B é também denominado AF-1 ou região moduladora, visto que está envolvido na ativação da transcrição. O domínio C consiste no domínio de ligação ao DNA (DBD). A região D contém a dobradiça, que confere flexibilidade entre o DBD e o domínio de ligação do ligante (LBD, região E). A parte terminal C da região E contém o AF-2, outro domínio importante para a ativação da transcrição. A região F não está bem definida. As funções desses domínios são discutidas de modo mais detalhado no texto. Os receptores com ligantes conhecidos, como hormônios esteroides, ligam-se na forma de homodímeros em meios-sítios repetidos invertidos. Outros receptores formam heterodímeros com o RXR correspondente nos elementos repetidos diretos. Pode haver espaçadores nucleotídicos de uma a cinco bases entre essas repetições diretas (DR1 a 5). Outra classe de receptores para os quais não foram determinados ligantes definitivos (receptores órfãos) ligam-se na forma de homodímeros para repetições diretas e, em certas ocasiões, na forma de monômeros a um meio-sítio único.

localização central, que possibilita a ligação do receptor com alta afinidade ao elemento de resposta. O DBD contém dois motivos de ligação em dedos de zinco (ver Figura 38-14), que determinam a ligação na forma de homodímeros, heterodímeros (habitualmente como um parceiro do receptor de retinoide X[RXR]) ou monômeros. O elemento de resposta alvo consiste em uma ou duas sequências de consenso de meio-sítio do DNA, dispostas como repetição invertida ou direta. O espaçamento entre elas ajuda a determinar a especificidade de ligação. Nestas condições, em geral, uma repetição direta com três, quatro ou cinco regiões espaçadoras de nucleotídeos especifica a ligação dos receptores de vitamina D, dos hormônios tireoidianos e do ácido retinoico, respectivamente, ao mesmo elemento de resposta de consenso (Tabela 42-1). Um **domínio de ligação do ligante** (**LBD**) multifuncional localiza-se na metade carboxiterminal do receptor. O LBD liga-se aos hormônios ou aos metabólitos com seletividade e, portanto, especifica uma determinada resposta biológica. O LBD também contém domínios que medeiam a ligação das proteínas do choque térmico, a dimerização, a localização nuclear e a transativação. Esta última função é facilitada pela função de ativação da transcrição carboxiterminal (**domínio AF-2**), que forma uma superfície necessária para a interação dos coativadores. Uma **região de dobradiça** altamente variável separa o DBD do LBD. Essa região confere flexibilidade ao receptor, de modo que possa assumir diferentes conformações de ligação ao DNA. Por fim, existe uma região aminoterminal altamente variável, que contém outro domínio de transativação, denominado **AF-1**. O domínio AF-1 provavelmente desempenha funções fisiológicas distintas por meio da ligação de diferentes proteínas reguladoras. Essa região do receptor, por meio do uso de promotores diferentes, sítios de *splicing* alternativo e múltiplos sítios de iniciação da tradução, fornece isoformas de receptores que compartilham uma identidade de DBD e LBD, mas que exercem respostas fisiológicas diferentes, devido à associação de vários correguladores com esse domínio AF-1 aminoterminal variável.

É possível classificar de várias maneiras esse grande número de receptores em grupos. Neste capítulo, esses receptores são discutidos de acordo com o modo pelo qual se ligam a seus respectivos elementos de DNA (Figura 42-12). Os receptores hormonais clássicos de glicocorticoides (GR), de mineralocorticoides (MR), de estrogênios (ER), de androgênios (AR) e de progestinas (PR) ligam-se na forma de homodímeros a sequências repetidas invertidas. Outros receptores hormonais, como os receptores dos hormônios tireoidianos (TR), do ácido retinoico (RAR) e da vitamina D (VDR), bem como os receptores que se ligam a vários ligantes metabólitos como o PPAR α, β,γ, FXR, LXR, PXR/SXR, e o CAR, ligam-se na forma de heterodímeros ao receptor de retinoide X (RXR) como parceiro para dirigir as sequências repetidas (ver Figura 42-12 e **Tabela 42-5**). Outro grupo de receptores órfãos que ainda não apresentam nenhum ligante conhecido liga-se na forma de homodímeros ou monômeros às sequências repetidas diretas.

Conforme ilustrado na Tabela 42-5, a descoberta da superfamília de receptores nucleares levou a uma compreensão essencial de como uma variedade de metabólitos e xenobióticos regulam a expressão dos genes e, por fim, o metabolismo, a desintoxicação e a eliminação dos produtos corporais normais e agentes exógenos, como os fármacos. Não é surpreendente que essa área constitua um campo fértil de pesquisa de novas intervenções terapêuticas.

Um grande número de correguladores dos receptores nucleares também participa da regulação da transcrição

A remodelação da cromatina (modificação das histonas, metilação do DNA), a modificação do fator de transcrição por várias atividades enzimáticas e a comunicação entre os receptores

TABELA 42-5 Receptores nucleares com ligantes especiais[1]

Receptor		Parceiro	Ligante	Processo afetado
Peroxissomo	$PPAR_{\alpha}$	RXR (DR1)	Ácidos graxos	Proliferação dos peroxissomos
Ativado por proliferador	$PPAR_{\beta}$		Ácidos graxos	Metabolismo dos lipídeos e dos carboidratos
	$PPAR_{\gamma}$		Ácidos graxos Eicosanoides, tiazolidinedionas	
Farnesoide X	FXR	RXR (DR4)	Farnesol, ácidos biliares	Metabolismo dos ácidos biliares
Fígado X	LXR	RXR (DR4)	Oxiesterois	Metabolismo do colesterol
Xenobiótico X	CAR	RXR (DR5)	Androstanos Fenobarbital Xenobióticos	Proteção contra determinados fármacos, metabólicos tóxicos e xenobióticos
	PXR	RXR (DR3)	Pregnanos Xenobióticos	

[1] Muitos membros da superfamília dos receptores nucleares foram descobertos por clonagem, e os ligantes correspondentes foram subsequentemente identificados. Esses ligantes não são hormônios no sentido clássico, porém desempenham uma função semelhante visto que eles ativam membros específicos da superfamília dos receptores nucleares. Os receptores descritos aqui formam heterodímeros com o RXR, apresentam sequências nucleotídicas variáveis e separam os elementos de ligação repetidos diretos (DR1 a 5). Esses receptores regulam uma variedade de genes que codificam o citocromo P450s (CYP), proteínas de ligação citosólicas e transportadores cassete de ligação do ATP (ABC) para influenciar o metabolismo e proteger as células contra fármacos e agentes nocivos.

nucleares e a maquinaria de transcrição basal são realizadas por interações entre as proteínas, com uma ou mais de uma classe de moléculas correguladoras. Atualmente, essas moléculas correguladoras ultrapassam o número de 100, sem incluir as variações de espécies e as de *splicing*. A primeira dessas moléculas a ser descrita foi a **proteína de ligação da CREB, a CBP**. A CBP, por meio de um domínio aminoterminal, liga-se à serina fosforilada 137 da CREB e medeia a transativação em reposta a AMPc. Por conseguinte, é descrita como um coativador. A CBP e seu parente próximo, a p300, interagem, direta ou indiretamente, com diversas moléculas sinalizadoras, incluindo a proteína ativadora 1 (AP-1), STAT, receptores nucleares e a CREB (**Figura 42-13**). A **CBP/p300** liga-se também à família p160 de coativadores descritos adiante, bem como a várias outras proteínas, incluindo o fator de transcrição viral Ela, a proteinoquinase $p90^{rsk}$ e a RNA-helicase A. Conforme assinalado anteriormente, é importante ressaltar que a **CBP/p300 também possui atividade intrínseca de histona acetiltransferase** (**HAT**). Algumas das numerosas ações da CBP/p300 que parecem depender das atividades enzimáticas intrínsecas e da capacidade de atuar como suporte para a ligação de outras proteínas estão ilustradas na Figura 42-11. Outros correguladores desempenham funções semelhantes.

Foram descritas várias outras famílias de moléculas coativadoras. Os membros da **família p160 de coativadores**, todos com cerca de 160 kDa, incluem: (1) SRC-1 e NCoA-1; (2) GRIP 1, TIF2 e (3) p/CIP, ACTR, AIB1, RAC3 e TRAM-1 (**Tabela 20-6**). Os diferentes nomes dos membros dentro de uma determinada subfamília frequentemente representam variações entre espécies ou pequenas variantes de *splicing*. Existe uma identidade de aminoácidos de cerca de 35% entre os membros das diferentes subfamílias. Os coativadores p160 compartilham várias atividades. Eles (1) ligam-se aos receptores nucleares de uma maneira

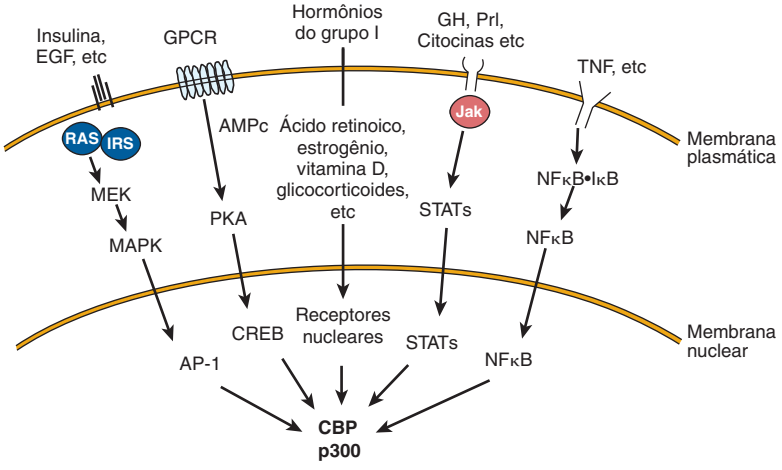


FIGURA 42-13 Diversas vias de transdução de sinais convergem para a CBP/p300. Muitos ligantes que se associam aos receptores de membrana ou nucleares acabam convergindo para a CBP/p300. São utilizadas diversas vias diferentes de transdução de sinais. (EGF, fator de crescimento epidérmico; GH, hormônio do crescimento; Prl, prolactina; TNF, fator de necrose tumoral; outras abreviaturas são apresentadas no texto.)

TABELA 42-6 Algumas proteínas correguladoras dos mamíferos

I.	**Família de coativadores de 300-kDa**	
A.	CBP	Proteína de ligação da CREB
B.	p300	Proteína de 300 kDa
II.	**Família de coativadores de 160-kDa**	
A.	SRC-1	Coativador do receptor de esteroide 1
	NCoA-1	Coativador do receptor nuclear 1
B.	TIF2	Fator intermediário da transcrição 2
	GRIP 1	Proteína de interação com o receptor de glicocorticoides
	NCoA-2	Coativador do receptor nuclear 2
C.	p/CIP	Proteína associada ao cointegrador 1
	ACTR	Ativador dos receptores de hormônios tireoidianos e do ácido retinoico
	AIB	
	RAC3	Amplificado no câncer de mama
	TRAM-1	Coativador 3 associado ao receptor
		Molécula ativadora do TR 1
III.	**Correpressores**	
A.	NCoR	Correpressor do receptor nuclear
B.	SMRT	Mediador silenciador do RXR e TR
IV.	**Subunidades mediadoras**	
A.	TRAPs	Proteínas associadas ao receptor dos hormônios tireoidianos
B.	DRIPs	Proteínas de interação com o receptor de vitamina D
C.	ARC	Cofator recrutado por ativador

dependente de agonista e do domínio de transativação do AF-2, (2) apresentam um motivo de hélice-α-hélice básico (bHLH) aminoterminal conservado (ver Capítulo 38), (3) exibem um domínio de transativação carboxiterminal fraco e um domínio de transativação aminoterminal mais forte em uma região que é necessária para a interação CBP/p160, (4) contêm, no mínimo, três dos **motivos LXXLL** necessários para a interação entre proteínas com outros coativadores, e (5), com frequência, possuem atividade de HAT. O papel da HAT é particularmente interessante, já que as mutações do domínio da HAT desativam muitos desses fatores de transcrição. O conceito atual sustenta que essas atividades HAT acetilam as histonas, o que facilita a remodelagem da cromatina em um ambiente eficiente para a transcrição. Portanto, a acetilação/desatilação das histonas desempenha um papel crítico na expressão dos genes. Por fim, é importante assinalar que foram descritos outros substratos proteicos para a acetilação mediada pela HAT, como ativadores da transcrição de ligação do DNA e outros correguladores. Esses eventos de MPT sem histonas provavelmente constituem um fator importante na resposta reguladora global.

Um pequeno número de proteínas, incluindo NCoR e SMRT, constitui a **família dos correpressores**. Esses correpressores atuam, pelo menos em parte, conforme mostra a Figura 42-2. Outra família inclui TRAPs, DRIPs e ARC (Tabela 42-6). Essas proteínas representam subunidade do mediador (Capítulo 36) e seu tamanho varia de 80 a 240 kDa, acredita-se que elas atuam na ligação do complexo receptor nuclear-coativador à RNA-polimerase II e outros componentes da maquinaria de transcrição basal.

Na atualidade, o papel exato desses coativadores está sendo objeto de investigação intensa. Muitas dessas proteínas possuem atividades enzimáticas intrínsecas. Isso é particularmente interessante, tendo em vista o fato de que foi proposto que a acetilação, a fosforilação, a metilação, a sumoilação e a ubiquitinação – bem como a proteólise e a translocação celular – alteram a atividade de alguns desses correguladores e seus alvos.

Parece que determinadas combinações de correguladores – e, portanto, diferentes combinações de ativadores e inibidores – sejam responsáveis por ações específicas induzidas por ligantes por meio de vários receptores. Além disso, essas interações em determinado promotor são dinâmicas. Em alguns casos, foram observados complexos constituídos de mais de 45 fatores de transcrição em um único gene.

RESUMO

- Os hormônios, as citocinas, as interleucinas e os fatores de crescimento utilizam uma variedade de mecanismos de sinalização para facilitar as respostas adaptativas das células.
- O complexo ligante-receptor atua como sinal inicial para os membros da família dos receptores nucleares.
- Os hormônios peptídicos/proteicos e catecolaminas da classe II, que se ligam aos receptores de superfície celular, geram uma variedade de sinais intracelulares, incluindo o AMPc, o GMPc, o Ca^{2+}, os fosfatilinositídeos e as cascatas de proteinoquinases.
- Muitas respostas hormonais são obtidas por meio de alterações na taxa de transcrição de genes específicos.
- A superfamília de proteínas de receptores nucleares desempenha um papel central na regulação da transcrição dos genes.
- Os receptores nucleares, cujos ligantes podem consistir em hormônios, metabólitos ou fármacos, ligam-se a elementos específicos do DNA na forma de homodímeros ou heterodímeros com RXR. Alguns deles – conhecidos como receptores órfãos – não têm nenhum ligante conhecido, porém ligam-se ao DNA e influenciam a transcrição.
- Outra grande família de proteínas correguladoras remodela a cromatina, modifica outros fatores de transcrição e transfere os receptores nucleares para a maquinaria de transcrição nasal.

REFERÊNCIAS

Arvanitakis L, Geras-Raaka E, Gershengorn MC: Constitutively signaling G-protein-coupled receptors and human disease. Trends Endocrinol Metab 1998;9:27

Aylon Y, Oren M: Living with p53, Dying of p53. Cell 2007;130:597.

Beene DL, Scott JD: A-kinase anchoring proteins take shape. Current Opinion in Cell Biol 2007;19:192.

Brummer T, Schmitz-Perffer C, Daly RJ: Docking proteins. FEBS Journal 2010; 277:4356–4369.

Cheung E, Kraus WL: Genomic Analyses of Hormone Signaling and Gene Regulation. Annu Rev Physiol 2010;72:191–218.

Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR: Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. Science 1994;264:1415.
Fantl WJ, Johnson DE, Williams LT: Signalling by receptor tyrosine kinases. Annu Rev Biochem 1993;62:453.
Hanoune J, Defer N: Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2001;41:145.
Jaken S: Protein kinase C isozymes and substrates. Curr Opin Cell Biol 1996;8:168.
Lee C-H, Olson P, Evans RM: Mini-review: Lipid metabolism, metabolic diseases and peroxisome proliferators-activated receptor. Endocrinology 2003;144:2201.
Métivier R, Gallais R, Tiffoche C, et al: Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promter. Nature 2008;452:45.
Métivier R, Reid G, Gannon F: Transcription in four dimensions: nuclear receptor-directed initiation of gene expression. EMBO Journal 2006;7:161.
Montminy M: Transcriptional regulation by cyclic AMP. Annu Rev Biochem 1997;66:807
Morris AJ, Malbon CC: Physiological regulation of G protein-linked signaling. Physiol Rev 1999;79:1373.
O'Malley B: Coregulators: from whence came these "master genes." Mol Endocrinology 2007;21:1009.
Rosenfeld MG, Lunyak VV, Glass CK: Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. Genes and Dev 2006;20:1405.
Sonoda J, Pei L, Evans RM: Nuclear receptors: decoding metabolic disease. Fed of European Biochem Soc 2007;582:2.
Tang X, Tang G, Ozcan S: Role of microRNAs in diabetes. Biochim Biophys Acta 2008;1779:697.
Walton KM, Dixon JE: Protein tyrosine phosphatases. Annu Rev Biochem 1993;62:101.

Questões para Estudo

Seção V

1. Em relação aos lipídeos da membrana, assinale a única resposta INCORRETA.
   A. O principal fosfolipídeo por massa nas membranas dos seres humanos é geralmente a fosfatidilcolina.
   B. Os glicolipídeos estão localizados nas lâminas interna e externa da membrana plasmática.
   C. O ácido fosfatídico é um precursor da fosfatidilcolina, mas não da fosfatidiletanolamina.
   D. A fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina estão localizadas principalmente na lâmina externa da membrana plasmática.
   E. O *"flip-flop"* dos fosfolipídeos nas membranas é muito lento.

2. Em relação às proteínas da membrana, assinale a única resposta INCORRETA.
   A. Devido a considerações estéricas, não podem existir hélices α nas membranas.
   B. Um gráfico de hidropatia ajuda a estimar se um determinado segmento de uma proteína é predominantemente hidrofóbico ou hidrofílico.
   C. Algumas proteínas estão ancoradas na lâmina externa da membrana plasmática por estruturas de glicofosfatidilinositol (GPI).
   D. A adenilil-ciclase é um marcador enzimático da lâmina plasmática.
   E. A mielina apresenta um teor muito alto de lipídeos em comparação com as proteínas.

3. No que se refere ao transporte nas membranas, assinale a única afirmação INCORRETA.
   A. O potássio apresenta uma menor densidade de carga do que o sódio e tende a atravessar as membranas mais rapidamente do que o sódio.
   B. O fluxo de íons por canais iônicos fornece um exemplo de transporte passivo.
   C. A difusão facilitada requer uma proteína como transportador.
   D. A inibição da Na^+K^+-ATPase inibe a captação dependente de sódio da glicose nas células intestinais.
   E. A insulina, ao recrutar transportadores da glicose na membrana plasmática, aumenta a captação de glicose nas células adiposas, mas não no músculo.

4. Em relação à Na^+K^+-ATPase, assinale a única afirmação INCORRETA.
   A. A sua ação mantém a alta concentração intracelular de sódio em comparação com a de potássio.
   B. Pode utilizar até 30% do consumo total de ATP de uma célula.
   C. É inibida pelos digitálicos, que são fármacos úteis em determinadas condições cardíacas.
   D. Localiza-se na membrana plasmática das células.
   E. A fosforilação está envolvida em seu mecanismo de ação, levando à sua classificação como transportador ativo impulsionado por ATP tipo P.

5. Quais as moléculas que permitem à célula responder a uma molécula sinalizadora extracelular específica?
   A. Carboidratos receptores específicos localizados na superfície interna da membrana plasmática.
   B. Bicamada lipídica plasmática.
   C. Canais iônicos.
   D. Receptores que reconhecem especificamente e ligam-se à molécula mensageira específica.
   E. Membranas nucleares intactas.

6. Indique o termo geralmente aplicado às moléculas mensageiras extracelulares que se ligam a proteínas receptoras transmembrana:
   A. Inibidor competitivo
   B. Ligante
   C. Curva de *scatchard*
   D. Substrato
   E. Chave

7. Na sinalização autócrina:
   A. As moléculas mensageiras alcançam as células-alvo por meio de sua passagem pela corrente sanguínea.
   B. As moléculas mensageiras percorrem apenas curtas distâncias por meio do espaço extracelular até células que estão próximas à célula que está gerando a mensagem.
   C. A célula que produz a mensagem expressa receptores em sua superfície que podem responder a este mensageiro.
   D. As moléculas mensageiras são, em geral, rapidamente degradadas e, portanto, só podem atuar em distâncias curtas.

8. Independentemente do modo pelo qual um determinado sinal é iniciado, o evento de ligação de ligante é propagado pelos mensageiros secundários ou recrutamento de proteínas. Qual o resultado final desses eventos de ligação?
   A. Ocorre ativação de uma proteína no meio de uma via de sinalização intracelular.
   B. Ocorre ativação de uma proteína na parte superior de uma via de sinalização intracelular.
   C. Ocorre ativação de uma proteína na parte superior de uma via de sinalização extracelular.
   D. Ocorre desativação de uma proteína na parte superior de uma via de sinalização intracelular.
   E. Ocorre ativação de uma proteína na parte inferior de uma via de sinalização intracelular.

9. Quais as características da superfamília de receptores nucleares que sugerem que essas proteínas evoluíram a partir de um ancestral comum?
   A. Todas elas se ligam ao mesmo ligante com alta afinidade.
   B. Todas elas funcionam dentro do núcleo.
   C. Todas elas estão sujeitas à fosforilação reguladora.
   D. Todas elas contêm regiões de alta semelhança/identidade na sequência de seus aminoácidos.

10. Que efeito a degradação dos complexos receptor-ligante após a sua internalização tem sobre a capacidade de uma célula de responder se for imediatamente exposta de novo ao mesmo hormônio?

A. A resposta celular é atenuada, devido a uma redução no número de receptores celulares.
B. A resposta celular é intensificada, devido a uma redução da competição receptor-ligante.
C. A resposta celular não é alterada a estímulos subsequentes.
D. A resposta hormonal da célula é, nessa fase, bimodal: intensificada por um curto período de tempo e, em seguida, atenuada.

11. Normalmente, qual a primeira reação após a ligação da maioria dos receptores proteína tirosina-quinases (RTK) ao seu ligante?
A. Trimerização do receptor
B. Degradação do receptor
C. Desnaturação do receptor
D. Dissociação do receptor
E. Dimerização do receptor

12. Onde se localiza o domínio catalítico dos receptores proteína tirosina-quinase?
A. Na superfície extracelular do receptor, imediatamente adjacente ao domínio de ligação do ligante.
B. Em uma proteína independente, que se liga rapidamente ao receptor com a ligação do ligante.
C. No domínio citoplasmático do receptor.
D. Dentro da porção transmembrana do receptor.

13. As subunidades das proteínas G heterotriméricas são denominadas subunidades ___,___ e ___
A. α, β e χ
B. α, β e δ
C. α, γ e δ
D. α, β e γ
E. γ, δ e η

14. Entre os receptores listados a seguir, quais os que podem conduzir um fluxo de íons através da membrana quando ligados a seus respectivos ligantes?
A. Receptores tirosina-quinases (RTK)
B. Receptores acoplados à proteína G (GPCR)
C. Receptores acoplados à proteína G
D. Receptores de hormônios esteroides
E. Canais regulados por ligantes

15. Quais dos seguintes compostos NÃO são um ligante natural que se liga aos receptores acoplados à proteína G?
A. Hormônios
B. Hormônios esteroides
C. Quimioatraentes
D. Derivados do ópio
E. Neurotransmissores

16. Coloque os eventos e a sinalização listados em sua ordem CORRETA.
1. A proteína G liga-se ao receptor ativado, formando um complexo receptor-proteína G.
2. Liberação do GDP pela proteína G.
3. Mudança na conformação das alças citoplasmáticas do receptor.
4. Ligação do GTP pela proteína G.
5. Aumento da afinidade do receptor por uma proteína G na superfície citoplasmática da membrana.
6. Ligação de um hormônio ou neurotransmissor a um receptor acoplado à proteína G.
7. Mudança de conformação na subunidade α da proteína G.
A. 6 – 3 – 5 – 1 – 2 – 4 – 7
B. 6 – 5 – 4 – 1 – 7– 2 – 3
C. 6 – 3 – 5 – 1 – 7 – 2 – 4
D. 6 – 7 – 3 – 5 – 1 – 2 – 4
E. 6 – 3 – 5 – 1 – 7 – 2 – 4

17. Quais as proteínas G heterotriméricas que acoplam receptores à adenilil-ciclase por meio da ativação das subunidades G_{α} ligadas ao GTP?
A. Família G_r
B. Família G_q
C. Família G_i
D. Família $G_{12/13}$
E. Família G_e

18. Qual o processo que precisa ocorrer para evitar a estimulação excessiva por um hormônio?
A. Os hormônios precisam ser degradados.
B. As proteínas G precisam ser recicladas e, em seguida, degradadas.
C. Os receptores precisam ser bloqueados para não continuar a ativar a proteína G.
D. Os receptores precisam sofrer dimerização.

19. Qual dos seguintes hormônios, denominado o hormônio da "luta ou fuga" é secretado pela medula suprarrenal?
A. Epinefrina
B. Ocitocina
C. Insulina
D. Glucagon
E. Somatostatina

20. Qual o hormônio secretado pelas células α do pâncreas em resposta a baixos níveis de glicemia?
A. Insulina
B. Glucagon
C. Estradiol
D. Epinefrina
E. Somatostatina

21. Nas células hepáticas, a expressão dos genes que codificam as enzimas gliconeogênicas, como a fosfoenolpiruvato-carboxiquinase, é induzida em resposta a qual das seguintes moléculas?
A. GMPc
B. Insulina
C. ATP
D. AMPc
E. Colesterol

22. O que ocorre com a proteinoquinase A (PKA) após a ligação do AMPc?
A. As subunidades reguladoras da PKA dissociam-se, com consequente ativação das subunidades catalíticas.
B. Em seguida, as subunidades catalíticas da PKA ligam-se a duas subunidades reguladoras, ativando, assim, as subunidades catalíticas.
C. As subunidades reguladoras inibitórias dissociam-se das subunidades catalíticas, inativando a enzima por completo.
D. As subunidades reguladoras estimuladoras dissociam-se das subunidades catalíticas, inibindo a enzima.
E. A fosfodiesterase liga-se às subunidades catalíticas, resultando em inativação da enzima.

SEÇÃO

VI

Tópicos Especiais

CAPÍTULO

43

Nutrição, Digestão e Absorção

David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever a digestão e a absorção dos carboidratos, dos lipídeos, das proteínas, das vitaminas e dos minerais.
- Explicar como as necessidades energéticas podem ser medidas e estimadas e como o cálculo do quociente respiratório possibilita a estimativa da mistura de combustíveis metabólicos oxidados.
- Descrever as consequências da desnutrição: marasmo, caquexia e *kwashiorkor*.
- Explicar como as necessidades proteicas são determinadas e por que há necessidade de maiores quantidades de determinadas proteínas do que outras para manter o balanço nitrogenado.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Além da água, a dieta precisa fornecer combustíveis metabólicos (principalmente carboidratos e lipídeos), proteínas (para o crescimento e a renovação das proteínas teciduais, e também como fonte de combustível metabólico), fibras (para a formação de volume no lúmen intestinal), sais minerais (que contêm elementos com funções metabólicas específicas), bem como vitaminas e ácidos graxos essenciais (compostos orgânicos necessários em quantidades menores para outras funções metabólicas e fisiológicas). Os polissacarídeos, os triacilgliceróis e as proteínas, que constituem a maior parte da dieta, devem ser hidrolisados em seus monossacarídeos, ácidos graxos e aminoácidos constituintes, respectivamente, antes de serem absorvidos e utilizados. Os minerais e as vitaminas devem ser liberados da complexa matriz do alimento para que possam ser absorvidos e utilizados.

A **desnutrição** global é disseminada, causando retardo do crescimento, comprometimento do sistema imune e redução da capacidade de trabalho. Por outro lado, nos países desenvolvidos, há um consumo excessivo de alimentos (especialmente gorduras), levando à obesidade e ao desenvolvimento de diabetes, doença cardiovascular e alguns tipos de câncer. As deficiências de vitamina A, de ferro e de iodo representam um importante problema de saúde em muitos países, e as deficiências de outras vitaminas e sais minerais constituem uma importante causa de comprometimento da saúde. Nos países desenvolvidos, a deficiência nutricional é rara, embora existam grupos vulneráveis da população que correm maior risco. O consumo de minerais e de vitaminas em quantidades adequadas para evitar a sua deficiência pode ser inadequado para promover condições ideais de saúde e longevidade.

A secreção excessiva de ácido gástrico, associada à infecção por *Helicobacter pylori*, pode levar ao desenvolvimento de **úlceras** gástricas e duodenais; pequenas alterações na composição da bile podem resultar em cristalização do colesterol sob a forma de **cálculos biliares**; o comprometimento da secreção do pâncreas exócrino (como na fibrose cística) leva à desnutrição e à esteatorreia. A **intolerância à lactose** resulta da deficiência de lactase, causando diarreia e desconforto intestinal quando o indivíduo consome lactose. A absorção de peptídeos intactos que estimulam as respostas humorais provoca **reações alérgicas**, e a **doença celíaca** é uma reação alérgica ao glúten do trigo.

DIGESTÃO E ABSORÇÃO DOS CARBOIDRATOS

A digestão dos carboidratos ocorre por hidrólise, com liberação de oligossacarídeos e, em seguida, de dissacarídeos e monossacarídeos livres. O aumento do nível de glicemia após a ingestão de uma dose de teste de um carboidrato, em comparação com aquele que ocorre após uma quantidade equivalente de glicose (na forma de glicose ou de um alimento de referência rico em amido) é conhecido como **índice glicêmico**. A glicose e a galactose apresentam um índice glicêmico de 1 (ou 100%), assim como a lactose, a maltose, a isomaltose e a trealose, que dão origem a esses dois primeiros monossacarídeos após a sua hidrólise. A frutose e os alcoóis de açúcar são absorvidos menos rapidamente e apresentam um índice glicêmico mais baixo, assim como a sacarose. O índice glicêmico do amido varia entre quase 1 (ou 100%) a quase 0, em virtude das taxas variáveis de hidrólise, enquanto os índices dos polissacarídeos que não contêm amido é de 0. Os alimentos com baixos índices glicêmicos são considerados mais benéficos, visto que causam menos flutuações na secreção de insulina. Os resistentes polissacarídeos de amido e sem amido fornecem substratos para a fermentação bacteriana no intestino grosso, e a formação resultante de butirato e outros ácidos graxos de cadeia curta asseguram uma fonte significativa de combustível para os enterócitos intestinais. Há algumas evidências de que o butirato também apresenta atividade antiproliferativa, proporcionando uma proteção contra o câncer colorretal.

As amilases catalisam a hidrólise do amido

A hidrólise do amido é catalisada pelas amilases salivar e pancreática, que catalisam a hidrólise aleatória das ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$, liberando dextrinas e, em seguida, uma mistura de glicose, maltose e maltotriose, bem como pequenas dextrinas ramificadas (a partir dos pontos de ramificação da amilopectina).

As dissacaridases são enzimas da borda em escova

As dissacaridases, como a maltase, a sacarase-isomaltase (enzima bifuncional que catalisa a hidrólise da sacarose e da isomaltose), a lactase e a trealase estão localizadas na borda em escova das células da mucosa intestinal, onde os monossacarídeos resultantes e aqueles provenientes da dieta são absorvidos. A deficiência congênita de lactase ocorre raramente em lactentes, resultando em intolerância à lactose e retardo do crescimento quando amamentados ou alimentados com fórmulas para lactentes. A deficiência congênita de sacarase-maltase ocorre entre os inuítes, levando a uma intolerância à sacarose, com diarreia persistente e retardo do crescimento quando a dieta contém sacarose.

Na maioria dos mamíferos e dos seres humanos, a atividade da lactase começa a declinar depois do desmame e desaparece quase por completo no final da adolescência, levando a uma **intolerância à lactose**. A lactose permanece no lúmen intestinal, onde atua como substrato para a fermentação bacteriana em lactato, resultando em desconforto abdominal e diarreia após o consumo de quantidades relativamente grandes. Em dois grupos de populações, os de ascendência da Europa Setentrional e as tribos nômades da África Subsaariana e Arábia, a lactase persiste depois do desmame e durante a vida adulta. Os mamíferos marinhos secretam um leite rico em gordura que não contém carboidratos, e seus filhotes carecem de lactase.

Existem dois mecanismos distintos para a absorção dos monossacarídeos no intestino delgado

A glicose e a galactose são absorvidas por um processo dependente de sódio. Ambas são transportadas pela mesma proteína transportadora (SGLT 1) e competem entre si pela absorção intestinal (**Figura 43-1**). Outros monossacarídeos são absorvidos por difusão mediada por carreadores. Como não são ativamente transportados, a frutose e os alcoóis de açúcar são apenas absorvidos a favor de seu gradiente de concentração, e, após o seu consumo moderadamente alto, uma parte pode permanecer no lúmen intestinal, atuando como substrato para a fermentação bacteriana. O consumo significativo de frutose e de alcoóis de açúcar pode resultar em diarreia osmótica.

DIGESTÃO E ABSORÇÃO DOS LIPÍDEOS

Os principais lipídeos da dieta são os triacilgliceróis e, em menor grau, os fosfolipídeos. São moléculas hidrofóbicas, que precisam

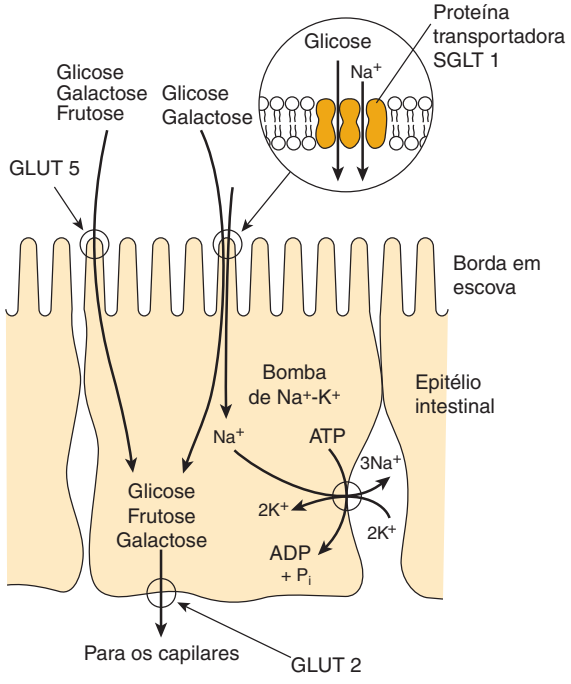


FIGURA 43-1 Transporte da glicose, frutose e galactose através do epitélio intestinal. O transportador SGLT 1 é acoplado à bomba de Na^+-K^+, possibilitando o transporte da glicose e da galactose contra seus gradientes de concentração. O transportador facilitador independente de Na^+, GLUT 5, permite que a frutose, a glicose e a galactose sejam transportadas a favor de seus gradientes de concentração. A saída de todos os açúcares da célula ocorre por meio do transportador facilitador GLUT 2.

ser hidrolisadas e emulsificadas em gotículas muito pequenas (micelas com diâmetro de 4 a 6 nm) para que possam ser absorvidas. As vitaminas lipossolúveis A, D, E e K, bem como uma variedade de outros lipídeos (incluindo colesterol), são absorvidas em sua forma dissolvida nas micelas lipídicas. A absorção de vitaminas lipossolúveis é comprometida no indivíduo que consome uma dieta muito pobre em gordura.

A hidrólise dos triacilgliceróis é iniciada pelas lipases lingual e gástrica, que atacam a ligação éster *sn*-3 para gerar 1,2-diacilgliceróis e ácidos graxos livres, os quais atuam como agentes emulsificadores. A lipase pancreática é secretada no intestino delgado e requer a presença de outra proteína pancreática, a colipase, para a sua atividade. Essa enzima é específica para as ligações éster primárias – as posições 1 e 3 nos triacilgliceróis – e resulta na liberação de 2-monoacilgliceróis e ácidos graxos livres como principais produtos finais da digestão luminal dos triacilgliceróis. A esterase pancreática no lúmen intestinal hidrolisa os monoacilgliceróis; entretanto, estes não são substratos apropriados, de modo que apenas ~25% dos triacilgliceróis ingeridos são totalmente hidrolisados a glicerol e ácidos graxos antes de sua absorção (**Figura 43-2**). Os sais biliares, que são produzidos no fígado e secretados na bile, possibilitam a emulsificação dos produtos da digestão dos lipídeos em micelas, juntamente com os fosfolipídeos da dieta e o colesterol secretado na bile (cerca de 2 g/dia), bem como o colesterol da dieta (cerca de 0,5 g/dia). Como as micelas são solúveis, elas permitem que os produtos da digestão, incluindo as vitaminas lipossolúveis, sejam transportados no ambiente aquoso do lúmen intestinal para entrar em contato direto com a borda em escova das células da mucosa intestinal, possibilitando a sua captação no epitélio. Os sais biliares permanecem no lúmen intestinal, onde a maior parte é absorvida do íleo para a **circulação êntero-hepática** (Capítulo 26). Dentro do epitélio intestinal, os 1-monoacilgliceróis são hidrolisados em ácidos graxos e glicerol, enquanto os 2-monoacilgliceróis são reacilados em triacilgliceróis por meio da **via dos monoacilgliceróis**. O glicerol liberado no lúmen intestinal é absorvido na veia porta do fígado; o glicerol liberado dentro do epitélio é reutilizado para a síntese de triacilgliceróis por meio da via normal do ácido fosfatídico (Capítulo 24). Os ácidos graxos de cadeia longa são esterificados para produzir triacilglicerol nas células da mucosa e, juntamente com os outros produtos da digestão dos lipídeos, são secretados como quilomícrons nos linfáticos, alcançando a circulação sanguínea através do ducto torácico (Capítulo 25). Os ácidos graxos de cadeia curta e de cadeia média são principalmente absorvidos na veia porta do fígado na forma de ácidos graxos livres.

O colesterol é absorvido dissolvido em micelas lipídicas e é esterificado principalmente na mucosa intestinal, antes de ser incorporado aos quilomícrons. Os esteróis e estanóis vegetais (nos quais o anel B é saturado) competem com o colesterol pela sua esterificação, porém não são substratos apropriados, de modo que existe uma quantidade aumentada de colesterol não esterificado nas células da mucosa. O colesterol não esterificado e outros esteróis são ativamente transportados das células da mucosa para o lúmen intestinal. Isso significa que os esteróis e os estanóis vegetais inibem efetivamente a absorção não apenas do colesterol da dieta, mas também da maior quantidade secretada na bile, reduzindo, assim, o conteúdo corporal total de colesterol e, consequentemente, a sua concentração plasmática.

DIGESTÃO E ABSORÇÃO DAS PROTEÍNAS

As proteínas nativas são resistentes à digestão, visto que poucas ligações peptídicas são acessíveis às enzimas proteolíticas sem antes ocorrer a desnaturação das proteínas da dieta (pelo calor da cocção e pela ação do ácido gástrico).

Vários grupos de enzima catalisam a digestão das proteínas

Existem duas classes principais de enzimas digestivas proteolíticas (**proteases**) que exibem diferentes especificidades pelos aminoácidos que formam a ligação peptídica a ser hidrolisada. As **endopeptidases** hidrolisam as ligações peptídicas entre aminoácidos específicos em toda a extensão da molécula. São as primeiras enzimas que atuam produzindo uma maior quantidade de fragmentos menores. A pepsina no suco gástrico catalisa a hidrólise de ligações peptídicas adjacentes a aminoácidos com cadeias laterais volumosas (aminoácidos aromáticos e de cadeia ramificada e metionina). A tripsina, a quimiotripsina e a elastase são secretadas no intestino delgado pelo pâncreas. A tripsina catalisa a hidrólise de ésteres de lisina e arginina, a quimiotripsina atua nos ésteres de aminoácidos aromáticos, e a elastase, em ésteres de pequenos aminoácidos alifáticos neutros. As **exopeptidases** catalisam a hidrólise das ligações peptídicas, uma de cada vez, a partir das extremidades dos peptídeos. As **carboxipeptidases**, que são secretadas no suco pancreático, liberam aminoácidos da extremidade carboxiterminal livre, enquanto as **aminopeptidases**, secretadas pelas células da mucosa intestinal, liberam aminoácidos da extremidade aminoterminal. As **dipeptidases** e as **tripeptidases** localizadas na borda em escova das células da mucosa intestinal catalisam a hidrólise dos di- e tripeptídeos, que não são substratos para as aminopeptidases e carboxipeptidases.

As proteases são secretadas na forma de **zimogênios** inativos; o sítio ativo da enzima é escondido por uma pequena região da cadeia peptídica, removida por hidrólise de uma ligação peptídica específica. O pepsinogênio é ativado a pepsina pelo ácido gástrico e pela pepsina ativada. No intestino delgado, o tripsinogênio, o precursor da tripsina, é ativado pela enteropeptidase, que é secretada pelas células epiteliais do duodeno; em seguida, a tripsina pode ativar o quimiotripsinogênio em quimiotripsina, a proelastase em elastase, a procarboxipeptidase em carboxipeptidase e a proaminopeptidase em aminopeptidase.

Os aminoácidos livres e pequenos peptídeos são absorvidos por mecanismos diferentes

O produto final da ação das endopeptidases e exopeptidases consiste em uma mistura de aminoácidos livres, dipeptídeos, tripeptídeos e oligopeptídeos, todos os quais são absorvidos. Os aminoácidos livres são absorvidos através da mucosa intestinal por transporte ativo dependente de sódio. Existem vários transportadores diferentes de aminoácidos, com especificidade para a natureza da cadeia lateral do aminoácido (grande ou pequena, neutra, ácida ou básica). Os diversos aminoácidos transportados por qualquer transportador competem entre si pela sua absorção e captação tecidual. Os dipeptídeos e os tripeptídeos entram na

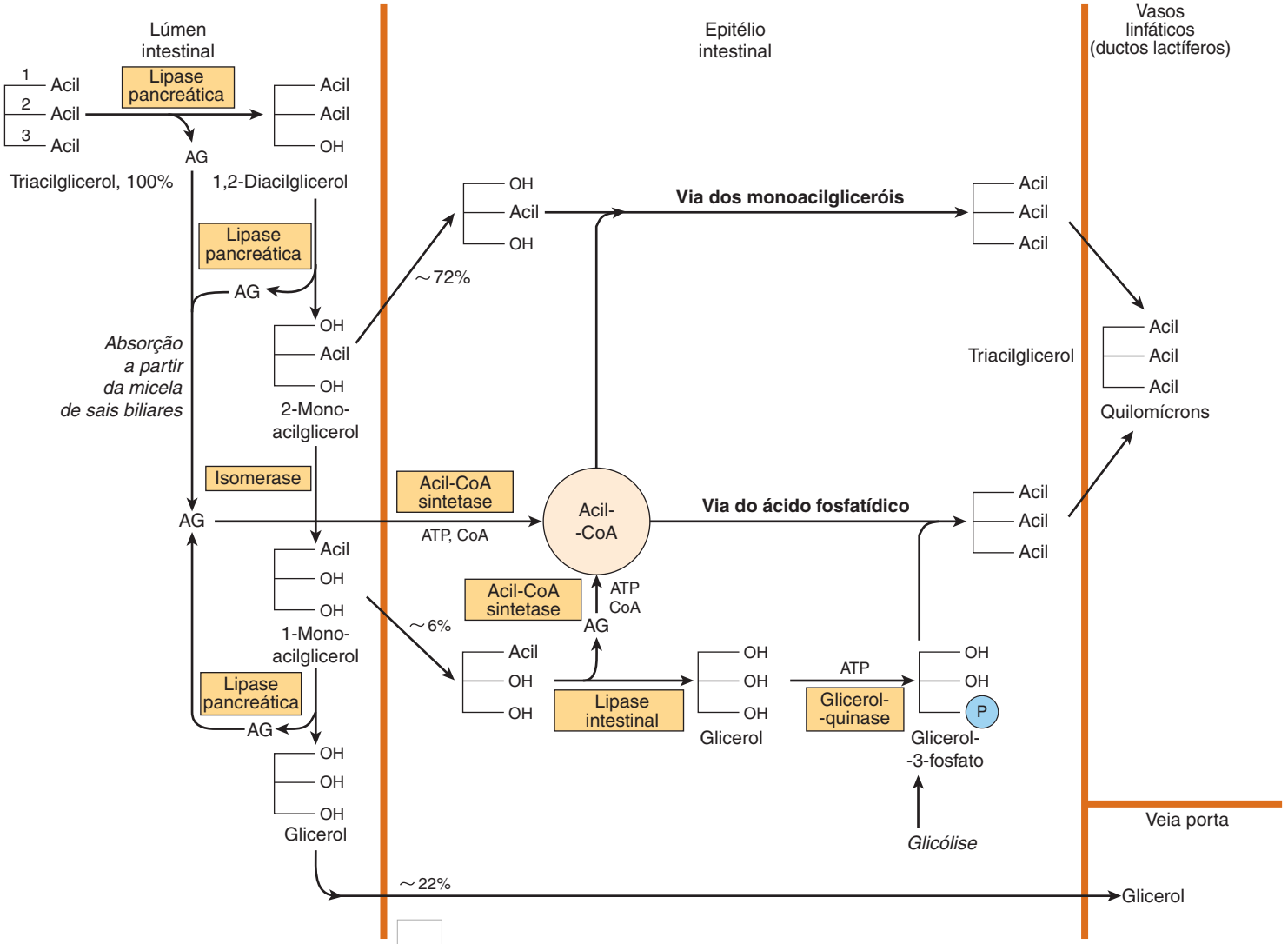


FIGURA 43-2 Digestão e absorção dos triacilgliceróis. Os valores fornecidos para a porcentagem de captação podem variar amplamente, porém indicam a importância relativa das três vias ilustradas.

borda em escova das células da mucosa intestinal, onde são hidrolisados em aminoácidos livres, que são então transportados para a veia porta do fígado. Os peptídeos relativamente grandes podem ser absorvidos em sua forma intacta, seja por captação pelas células epiteliais da mucosa (transcelular) ou pela sua passagem entre as células epiteliais (paracelular). Muitos desses peptídeos são grandes o suficiente para estimular a formação de anticorpos – constituindo a base das **reações alérgicas** aos alimentos.

DIGESTÃO E ABSORÇÃO DE VITAMINAS E MINERAIS

As vitaminas e os minerais são liberados dos alimentos durante a digestão, embora esse processo não seja completo, e a disponibilidade de vitaminas e minerais dependa do tipo de alimento e, particularmente no caso dos minerais, da presença de compostos quelantes. As vitaminas lipossolúveis são absorvidas nas micelas lipídicas, que resultam na digestão das gorduras; as vitaminas hidrossolúveis e a maioria dos sais minerais são absorvidas pelo intestino delgado por transporte ativo ou por difusão mediada por carreador, seguida de ligação às proteínas intracelulares para permitir uma captação concentradora. A absorção da vitamina B_{12} depende de uma proteína transportadora específica, o fator intrínseco (Capítulo 44); a absorção de cálcio depende da vitamina D; a absorção de zinco provavelmente requer um ligante de ligação do zinco secretado pelo pâncreas exócrino; e a absorção de ferro é limitada (ver adiante).

A absorção do cálcio é dependente da vitamina D

Além de seu papel na regulação da homeostasia do cálcio, a vitamina D é necessária para a absorção intestinal de cálcio. A síntese da proteína intracelular de ligação do cálcio, a **calbindina**, necessária para a absorção do cálcio, é induzida pela vitamina D. A vitamina D também atua para recrutar transportadores de cálcio até a superfície celular, aumentando rapidamente a absorção de cálcio – processo que não depende da síntese de novas proteínas.

O ácido fítico (inositol hexafosfato) nos cereais liga-se ao cálcio no lúmen intestinal, impedindo a sua absorção. Outros minerais, incluindo o zinco, também são quelados pelo fitato. Isso representa um problema principalmente nos indivíduos que consomem grandes quantidades de produtos a base de trigo integral não fermentado; a levedura contém uma enzima, a **fitase**, que desfosforila o fitato, tornando-o inativo. As altas concentrações de ácidos graxos no lúmen intestinal, que ocorrem em consequência do comprometimento da absorção de gorduras, também podem reduzir a absorção do cálcio, formando sais de cálcio insolúveis; algumas vezes, a ingestão elevada de oxalato pode causar deficiência, visto que o oxalato de cálcio é insolúvel.

A absorção de ferro é limitada e rigorosamente controlada, mas pode ser aumentada pela vitamina C e pelo álcool

Embora a deficiência de ferro constitua um problema comum tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, cerca de 10% dos indivíduos são geneticamente vulneráveis à sobrecarga de ferro (**hemocromatose**), e, para reduzir o risco de efeitos adversos da formação não enzimática de radicais livres por sais de ferro, a absorção é rigorosamente regulada. O ferro inorgânico é transportado para a célula da mucosa por um transportador de íons metálicos divalentes ligado a prótons e acumula-se intracelularmente pela sua ligação à **ferritina**. O ferro deixa a célula da mucosa por meio de uma proteína transportadora, a ferroportina, porém apenas na presença de **transferrina** livre no plasma para a sua ligação. Quando a transferrina está saturada de ferro, qualquer ferro que tenha se acumulado nas células da mucosa é perdido com a descamação celular. A expressão do gene da ferroportina (e, possivelmente também, do transportador de íons metálicos divalentes) é infrarregulada pela hepcidina, um peptídeo secretado pelo fígado quando as reservas corporais de ferro estão adequadas. Em resposta à hipoxia, anemia ou hemorragia, ocorre redução na síntese de hepcidina, resultando em aumento da síntese de ferroportina e absorção aumentada de ferro (**Figura 43-3**). Em consequência dessa barreira mucosa, somente ~10% do ferro da dieta é absorvido, e apenas 1 a 5% a partir de numerosos alimentos vegetais (Capítulo 50).

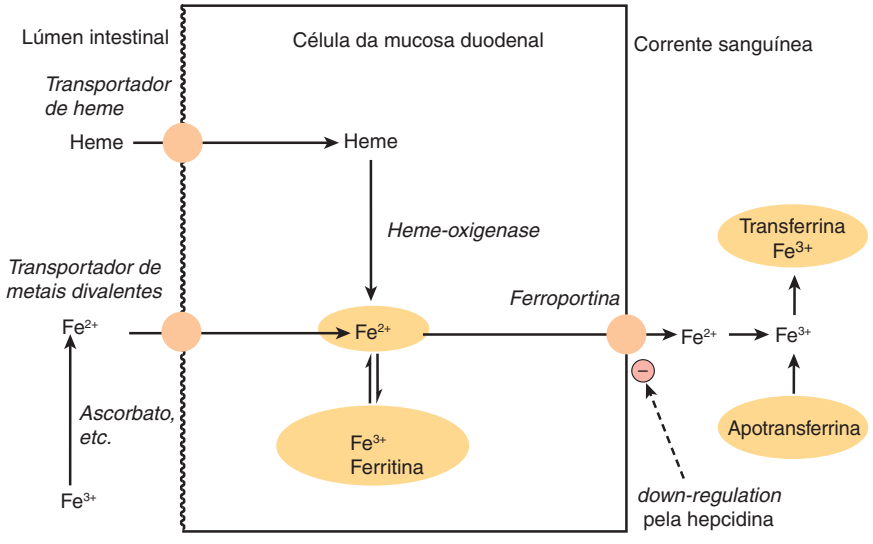


FIGURA 43-3 Absorção do ferro. A hepcidina secretada pelo fígado infrarregula a síntese de ferroportina e limita a absorção de ferro.

O ferro inorgânico é absorvido em seu estado Fe^{2+} (reduzido), de modo que a presença de agentes redutores aumenta a sua absorção. O composto mais efetivo é a **vitamina C**, e, embora a ingestão de 40 a 80 mg/dia de vitamina C seja suficiente para atender às demandas, uma ingestão de 25 a 50 mg por refeição aumenta a absorção do ferro, particularmente quando são utilizados sais de ferro no tratamento da anemia ferropriva. O álcool e a frutose também aumentam a absorção do ferro. O ferro do heme proveniente das carnes é absorvido separadamente e é consideravelmente mais disponível do que o ferro inorgânico. Entretanto, a absorção tanto do ferro inorgânico quanto do ferro do heme é afetada pelo cálcio – um copo de leite ingerido com uma refeição reduz significativamente a disponibilidade de ferro.

BALANÇO ENERGÉTICO: NUTRIÇÃO EXCESSIVA E SUBNUTRIÇÃO

Depois da água, a primeira necessidade corporal é de combustíveis metabólicos – gordura, carboidratos e aminoácidos das proteínas (Tabela 16-1). A ingestão alimentar acima do gasto energético leva à **obesidade**, enquanto uma ingestão abaixo do gasto calórico provoca emagrecimento e perdas, **marasmo** e ***kwashiorkor***. Tanto a obesidade quanto a desnutrição severas estão associadas a um aumento da mortalidade. O índice de massa corporal = peso (em kg) /altura^2 (em m) é comumente usado como maneira de expressar a obesidade relativa; a faixa desejável situa-se entre 20 e 25.

As necessidades energéticas são estimadas pela determinação do gasto energético

O gasto energético pode ser calculado diretamente pela determinação do calor gerado pelo corpo; entretanto é normalmente estimado por meios indiretos a partir do consumo de oxigênio. Existe um gasto energético de ~20 KJ/L de oxigênio consumido, independentemente de o combustível metabolizado ser carboidrato, gordura ou proteína (Tabela 16-1).

O cálculo da razão entre o volume de dióxido de carbono produzido e o volume de oxigênio consumido (**quociente respiratório, QR**) fornece uma indicação da mistura de combustíveis metabólicos oxidados (Tabela 16-1).

Uma técnica mais recente permite a estimativa do gasto energético total no decorrer de um período de 1 a 2 semanas com o uso da água duplamente marcada com isótopos, $^2H_2{}^{18}O$. O ^2H é eliminado do corpo somente na água, enquanto o ^{18}O sai do corpo na água e no dióxido de carbono; a diferença na taxa de perda dos dois marcadores possibilita a estimativa da produção total de dióxido de carbono e, portanto, do consumo de oxigênio e do gasto energético.

A **taxa metabólica basal** (**TMB**) é o gasto energético do corpo em repouso, mas não durante o sono, em condições controladas de neutralidade térmica, medido durante cerca de 12 h após a última refeição. A TMB depende do peso, da idade e do sexo do indivíduo. O gasto energético total depende da TMB, da energia necessária para a atividade física e do custo energético na síntese de reservas no estado alimentado. Portanto, é possível calcular as necessidades energéticas de um indivíduo com base no seu peso corporal, na idade, no sexo e no nível de atividade física. O peso corporal afeta a TMB, visto que existe uma maior quantidade de tecido ativo em um corpo mais volumoso. A redução da TMB com a idade, mesmo quando o peso corporal permanece constante, resulta da substituição do tecido muscular por tecido adiposo, que é metabolicamente menos ativo. De forma semelhante, as mulheres apresentam uma TMB significativamente mais baixa do que os homens com o mesmo peso corporal e idade, visto que os corpos das mulheres contêm uma quantidade proporcionalmente maior de tecido adiposo.

As necessidades energéticas aumentam com a atividade

A maneira mais útil de expressar o custo energético da atividade física é na forma de múltiplo de TMB. As atividades sedentárias consomem apenas cerca de 1,1 a 1,2 × TMB. Em contrapartida, o esforço vigoroso, como subir escadas, caminhar em trilhas e escalar montanhas, etc., pode consumir 6 a 8 × TMB.

Dez por cento da energia fornecida por uma refeição podem ser consumidos na formação das reservas

Ocorre um aumento considerável da taxa metabólica depois de uma refeição (**termogênese induzida pela dieta**). Uma pequena parte é representada pelo custo energético da secreção das enzimas digestivas e do transporte ativo dos produtos da digestão; a maior parte resulta da síntese das reservas de glicogênio, triacilgliceróis e proteínas.

Existem duas formas extremas de desnutrição

O **marasmo** pode ocorrer tanto em adultos quanto em crianças e é observado em grupos vulneráveis de todas as populações. O ***kwashiorkor*** acomete apenas crianças e só foi relatado nos países em desenvolvimento. A característica que distingue o *kwashiorkor* consiste na retenção de líquidos, resultando em edema, e na infiltração gordurosa do fígado. O marasmo é um estado de emagrecimento extremo, que resulta de um balanço energético negativo prolongado. Além do esgotamento das reservas de gordura corporal, há também perda da massa muscular e, à medida que a doença evolui, perda das proteínas do coração, do fígado e dos rins. Os aminoácidos liberados pelo catabolismo das proteínas teciduais são utilizados como fonte de combustível metabólico e como substratos para a gliconeogênese, visando manter um suprimento de glicose para o cérebro e para os eritrócitos (Capítulo 20). Em consequência da síntese reduzida de proteínas, ocorrem comprometimento da resposta imune e maior risco de infecções. Observa-se um comprometimento da proliferação celular na mucosa intestinal, resultando em diminuição da área de superfície da mucosa intestinal e redução na absorção desses nutrientes, quando disponíveis.

Os pacientes com câncer avançado e Aids apresentam desnutrição

Os pacientes com câncer avançado, com infecção pelo HIV e Aids e com várias outras doenças crônicas frequentemente apresentam desnutrição, uma condição denominada **caquexia**. Fisicamente, esses pacientes exibem todos os sinais de marasmo, porém há uma perda consideravelmente maior de proteínas corporais do

que aquela observada no jejum prolongado. A secreção de citocinas em resposta à infecção e ao câncer aumenta o catabolismo das proteínas teciduais pela via da ubiquitina-proteassomo dependente de ATP, com consequente aumento do gasto energético. Isso difere do marasmo, no qual a síntese de proteínas está reduzida, enquanto o catabolismo não é afetado. Os pacientes são **hipermetabólicos**, isto é, apresentam um aumento considerável da TMB. Além da ativação da via da ubiquitina-proteassomo do catabolismo proteico, três outros fatores estão envolvidos. Muitos tumores metabolizam a glicose de modo anaeróbio, liberando lactato. Em seguida, o lactato é utilizado para a gliconeogênese hepática, um processo que consome energia, com custo efetivo de seis ATP para cada mol de glicose que entra no ciclo (ver Figura 20-4). Ocorre aumento da estimulação das **proteínas desacopladoras** mitocondriais pelas **citocinas**, resultando em termogênese e oxidação aumentada dos combustíveis metabólicos. Há um **ciclo fútil de lipídeos**, visto que a lipase sensível ao hormônio é ativada por um proteoglicano secretado pelos tumores, resultando na liberação de ácidos graxos do tecido adiposo e reesterificação, com gasto de ATP, em triacilgliceróis no fígado, que são então exportados na forma de VLDL.

O *kwashiorkor* acomete crianças subnutridas

Além da perda da massa muscular, da perda da mucosa intestinal e do comprometimento das respostas imunes observados no marasmo, as crianças com ***kwashiorkor*** apresentam várias manifestações típicas. A característica que define o *kwashiorkor* é o **edema**, que está associado a uma concentração diminuída de proteínas plasmáticas. Além disso, ocorre hepatomegalia em consequência do acúmulo de gordura. No passado, acreditava-se que a causa do *kwashiorkor* fosse uma carência de proteínas, com ingestão mais ou menos apropriada de combustíveis; entretanto, a análise das dietas das crianças acometidas mostra que não é esse o caso. A deficiência de proteínas leva a um atraso do crescimento, e as crianças com *kwashiorkor* apresentam menor ocorrência de retardo do crescimento do que aquelas com marasmo. Além disso, o edema começa a regredir no início do tratamento, quando a criança ainda está recebendo uma dieta hipoproteica.

Com muita frequência, o *kwashiorkor* é precipitado por infecção. Superposta à deficiência alimentar generalizada, existe provavelmente uma deficiência de nutrientes antioxidantes, como o zinco, o cobre, o caroteno e as vitaminas C e E. A **explosão respiratória** em resposta à infecção resulta na produção dos **radicais livres** de oxigênio e halogênio como parte da ação citotóxica dos macrófagos estimulados. Esse estresse oxidante adicional desencadeia o desenvolvimento do *kwashiorkor* (ver Capítulo 54).

NECESSIDADES DE PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS

As necessidades de proteínas podem ser determinadas pela medição do balanço nitrogenado

O estado de nutrição proteica pode ser avaliado pela determinação da ingestão da dieta e eliminação de compostos nitrogenados do corpo. Embora os ácidos nucleicos também contenham nitrogênio, as proteínas constituem a principal fonte dietética de nitrogênio, e a determinação do aporte total de nitrogênio fornece uma boa estimativa da ingestão de proteínas (mg de $N \times 6{,}25$ = mg de proteína, visto que o N constitui 16% da maioria das proteínas). A eliminação do N do corpo ocorre principalmente na forma de ureia e de quantidades menores de outros compostos na urina, bem como nas proteínas não digeridas nas fezes; quantidades significativas também podem ser perdidas no suor e com a descamação da pele. A diferença entre o aporte e a eliminação de compostos nitrogenados é conhecida como **balanço nitrogenado**. Três estados podem ser definidos. No adulto saudável, o balanço nitrogenado está em **equilíbrio** quando a ingestão é igual à perda, e não ocorre nenhuma mudança no conteúdo corporal total de proteínas. Nas crianças em crescimento, na mulher grávida ou no indivíduo em recuperação de perda proteica, a excreção de compostos nitrogenados é menor do que o aporte dietético, e ocorre uma retenção efetiva de nitrogênio no corpo, sob a forma de proteínas – **balanço nitrogenado positivo**. Em resposta a traumatismos ou infecções, ou se a ingestão de proteínas for inadequada para suprir as necessidades, ocorre perda efetiva do nitrogênio proteico do corpo – **balanço nitrogenado negativo**. Exceto durante a reposição das perdas proteicas, o equilíbrio do nitrogênio pode ser mantido em qualquer nível de ingestão proteica acima das necessárias. Uma elevada ingestão de proteína não leva a um balanço nitrogenado positivo; embora aumente a taxa de síntese proteica, ela também aumenta a taxa de catabolismo das proteínas, de modo que o equilíbrio do nitrogênio é mantido, apesar de uma maior taxa de renovação proteica. Tanto a síntese quanto o catabolismo das proteínas consomem ATP, e essa taxa aumentada de renovação proteica explica o aumento da termogênese induzida pela dieta observado em indivíduos que consomem uma dieta hiperproteica.

O catabolismo contínuo das proteínas teciduais cria a necessidade de proteínas da dieta, mesmo no adulto que não está em crescimento; embora alguns dos aminoácidos liberados possam ser reutilizados, grande parte é usada na gliconeogênese durante o jejum. Os estudos de balanço nitrogenado mostram que a necessidade diária média é de 0,66 g de proteína/kg de peso corporal (0,825 levando em consideração as variações individuais), ou ~55 g/dia – 0,825% do aporte energético. Nos países desenvolvidos, a ingestão média de proteínas situa-se em torno de 80 a 100 g/dia, isto é, 14 a 15% do aporte energético. Como as crianças em crescimento estão aumentando o conteúdo de proteínas do corpo, elas têm uma necessidade proporcionalmente maior do que os adultos e devem estar em balanço nitrogenado positivo. Mesmo assim, a necessidade é relativamente pequena em comparação com a necessidade para a renovação proteica. Em alguns países, a ingestão de proteínas é insuficiente para suprir essas necessidades, resultando em atraso do crescimento. Há poucas evidências ou nenhuma de que os atletas e fisiculturistas necessitem de grandes quantidades de proteína; o simples consumo de mais de uma dieta normal, fornecendo cerca de 14% da energia a partir das proteínas, irá assegurar uma quantidade de proteína mais do que suficiente para a síntese aumentada das proteínas musculares – a principal necessidade consiste em um aumento do aporte energético para possibilitar a síntese aumentada de proteínas.

Ocorre perda de proteínas do corpo em resposta ao traumatismo e à infecção

Uma das reações metabólicas a traumatismos significativos, como queimadura, fratura de membro ou cirurgia, consiste em aumento do catabolismo efetivo das proteínas teciduais, em resposta às citocinas e aos hormônios glicocorticoides, bem como em decorrência da utilização excessiva de treonina e de cisteína na síntese das **proteínas de fase aguda**. Pode haver uma perda de até 6 a 7% das proteínas corporais totais no decorrer de 10 dias. O repouso prolongado ao leito resulta em perda considerável de proteínas, devido à atrofia dos músculos. Pode ocorrer aumento do catabolismo das proteínas em resposta às citocinas, e, sem o estímulo do exercício físico, essa proteína não é totalmente substituída. A proteína perdida é reposta durante a **convalescença**, quando se observa um balanço nitrogenado positivo. Nessa situação também, assim como no caso dos atletas, uma dieta normal é adequada para possibilitar essa síntese proteica de reposição.

A necessidade não é apenas de proteínas, mas também de aminoácidos específicos

Nem todas as proteínas são nutricionalmente equivalentes. Algumas são necessárias em maiores quantidades do que outras para que o balanço nitrogenado se mantenha, visto que as diferentes proteínas contêm quantidades distintas dos vários aminoácidos. O organismo necessita de aminoácidos em proporções corretas para repor as proteínas teciduais, e eles podem ser divididos em dois grupos: **essenciais** e **não essenciais**. Existem nove aminoácidos essenciais ou indispensáveis, que não podem ser sintetizados pelo organismo: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina. Se um desses aminoácidos estiver ausente ou presente em quantidades inadequadas, independentemente da ingestão total de proteínas, não será possível manter o balanço nitrogenado, visto que não haverá quantidades suficientes do aminoácido específico para a síntese de proteínas.

Dois aminoácidos, a cisteína e a tirosina, podem ser sintetizados pelo organismo, porém apenas a partir de aminoácidos essenciais precursores – a cisteína a partir da metionina, e a tirosina a partir da fenilalanina. Desse modo, a ingestão dietética de cisteína e de tirosina afeta as necessidades de metionina e fenilalanina. Os onze aminoácidos restantes encontrados nas proteínas são classificados como não essenciais ou dispensáveis, visto que podem ser sintetizados, contanto que haja uma quantidade total suficiente de proteína na dieta. Se um desses aminoácidos for omitido da dieta, o balanço nitrogenado ainda poderá ser mantido. Entretanto, apenas três aminoácidos, a alanina, o aspartato e o glutamato, podem ser considerados como verdadeiramente dispensáveis; são sintetizados a partir de intermediários metabólicos comuns (piruvato, oxalacetato e cetoglutarato, respectivamente). Os aminoácidos restantes são classificados como não essenciais; todavia, em algumas circunstâncias, a demanda pode superar a capacidade de síntese.

RESUMO

- A digestão envolve a hidrólise das moléculas dos alimentos em moléculas menores para absorção pelo epitélio gastrintestinal. Os polissacarídeos são absorvidos como monossacarídeos; os triacilgliceróis, como 2-monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol; e as proteínas como aminoácidos e peptídeos pequenos.
- Os distúrbios da digestão surgem em consequência de: (1) deficiência de enzimas, como, por exemplo, lactase e sacarase; (2) má absorção, por exemplo, de glicose e galactose, em decorrência de defeitos do cotransportador de Na^+-glicose (SGLT 1); (3) absorção de polipeptídeos não hidrolisados, desencadeando respostas imunes, como, por exemplo, na doença celíaca; e (4) precipitação do colesterol da bile na forma de cálculos biliares.
- Além da água, a dieta deve fornecer combustíveis metabólicos (carboidratos e gorduras) para o crescimento e para a atividade do organismo; proteínas para a síntese das proteínas teciduais; fibras para a formação de volume no conteúdo intestinal; sais minerais para o desempenho de funções metabólicas específicas (Capítulo 44); ácidos graxos poli-insaturados das famílias *n*-3 e *n*-6; e vitaminas – compostos orgânicos necessários em pequenas quantidades para outras funções essenciais (Capítulo 44).
- A síntese de proteínas requer vinte aminoácidos diferentes, dos quais nove são essenciais na dieta humana. A quantidade de proteína necessária pode ser determinada por estudos do balanço nitrogenado e é afetada pela quantidade de proteína – as quantidades de aminoácidos essenciais presentes nas proteínas da dieta em comparação com as quantidades necessárias para a síntese das proteínas teciduais.
- A desnutrição ocorre em duas formas extremas: o marasmo, observado em adultos e em crianças, e o *kwashiorkor,* que ocorre em crianças. A doença crônica também pode levar a uma subnutrição (caquexia) em consequência do hipermetabolismo.
- A nutrição excessiva leva a um aporte energético excessivo e está associada a doenças crônicas não transmissíveis, como a obesidade, o diabetes do tipo 2, a aterosclerose, o câncer e a hipertensão.

REFERÊNCIAS

Bender DA, Bender AE: *Nutrition: A Reference Handbook . Oxford University Press*, 1997.

Fuller MF, Garllick PJ: Human amino acid requirements: can the controversy be resolved? Ann Rev Nutr 1994;14:217.

Geissler C, Powers HJ (editors): *Human Nutrition*, 12th ed. Elsevier, 2010.

Gibney MJ, Lanham-New S, Cassidy A, et al: *Introduction to Human Nutrition, The Nutrition Society Textbook Series*, 2nd ed. Wiley–Blackwell, 2009.

Institute of Medicine: *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients)*. National Academies Press, 2002.

Pencharz PB, Ball RO: Diff erent approaches to defi ne individual amino acid requirements. Ann Rev Nutr 2003;23:101.

Royal College of Physicians: *Nutrition and Patients*—A Doctor's Responsibility . Royal College of Physicians, 2002.

Swallow DM: Genetic infl uences on carbohydrate digestion. Nutr Res Rev 2003;16:37 .

World Health Organization Technical Report Series 894: *Obesity—Preventing and Managing the Global Epidemic*. WHO, 2000.

World Health Organization Technical Report Series 916: *Diet and the Prevention of Chronic Diseases*. WHO, 2003.

World Health Organization Technical report Series 935: *Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition*. WHO, 2007.

CAPÍTULO

44

Micronutrientes: Vitaminas e Minerais

David A. Bender, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever como os valores de referência para ingestão de vitaminas e de minerais são determinados e explicar por que os valores de referência publicados por diferentes autoridades nacionais e internacionais diferem entre si.
- Definir uma vitamina e descrever o metabolismo, as principais funções, as doenças por deficiência associadas a um aporte inadequado e a toxicidade causada pelo consumo excessivo de vitaminas.
- Explicar por que os sais minerais são necessários na dieta.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

As vitaminas constituem um grupo de nutrientes orgânicos necessários em quantidades pequenas para uma variedade de funções bioquímicas, que geralmente não podem ser sintetizadas pelo organismo e que, portanto, devem ser fornecidas pela dieta.

As vitaminas lipossolúveis são compostos hidrofóbicos que só podem ser absorvidos de modo eficiente quando há uma absorção normal de gorduras. À semelhança de outros lipídeos, essas vitaminas são transportadas no sangue em lipoproteínas ou fixadas a proteínas de ligação específicas. As vitaminas lipossolúveis desempenham diversas funções – por exemplo, a vitamina A está envolvida na visão e na diferenciação celular; a vitamina D atua no metabolismo do cálcio e do fosfato, bem como na diferenciação celular; a vitamina E atua como antioxidante; e a vitamina K desempenha uma função na coagulação sanguínea. Assim como a insuficiência nutricional, os distúrbios que afetam a digestão e a absorção das vitaminas lipossolúveis, como dieta muito pobre em gordura, esteatorreia e distúrbios do sistema biliar, podem levar a síndromes de deficiência, incluindo cegueira noturna e xeroftalmia (vitamina A); raquitismo em crianças pequenas e osteomalacia nos adultos (vitamina D); distúrbios neurológicos e anemia hemolítica do recém-nascido (vitamina E); e doença hemorrágica do recém-nascido (vitamina K). A ingestão excessiva das vitaminas A e D pode resultar em toxicidade. A vitamina A e os carotenos (muitos dos quais são precursores da vitamina A), bem como a vitamina E, são antioxidantes (Capítulo 45) e desempenham um possível papel na prevenção da aterosclerose e do câncer.

As vitaminas hidrossolúveis são as vitaminas B e C, as quais funcionam principalmente como cofatores enzimáticos. O ácido fólico atua como carreador de unidades de um carbono. A deficiência de uma única vitamina do complexo B é rara, visto que as dietas pobres estão mais frequentemente associadas a **estados de deficiência múltipla**. Todavia, existem síndromes específicas características da deficiência de cada vitamina, como, por exemplo, o beribéri (tiamina); a queilose, a glossite e a seborreia (riboflavina); a pelagra (niacina); a anemia megaloblástica, a acidúria metilmalônica e a anemia perniciosa (vitamina B_{12}); a anemia megaloblástica (ácido fólico); e o escorbuto (vitamina C).

Os elementos minerais inorgânicos que desempenham uma função no organismo precisam ser fornecidos pela dieta. Quando a ingestão é insuficiente, podem surgir sinais de deficiência, como, por exemplo, anemia (ferro) e cretinismo e bócio (iodo). O consumo excessivo de vitaminas pode ser tóxico.

A determinação das necessidades de micronutrientes depende dos critérios de normalidade escolhidos

Para cada nutriente, existe uma faixa de consumo entre o que é claramente inadequado, resultando em **doença clínica por deficiência**, e aquilo que está muito acima da capacidade metabólica do organismo, podendo resultar em sinais de **toxicidade**. Entre esses dois extremos, existe um nível de consumo que é adequado para a saúde normal e para a manutenção da integridade metabólica. Nem todos os indivíduos têm as mesmas necessidades de nutrientes, mesmo quando elas são calculadas com base nas dimensões corporais e no gasto energético. Existe uma faixa de necessidades individuais de até 25% em torno do valor médio. Por conseguinte, para avaliar a suficiência das dietas, é necessário estabelecer um ní-

vel de referência de ingestão alta o suficiente para assegurar que o indivíduo não desenvolva deficiência, nem corra risco de toxicidade. Supondo que as necessidades individuais estejam distribuídas em um padrão estatisticamente normal em torno da necessidade média observada, a faixa de ±2 × o desvio padrão (DP) em torno da média inclui, então, as necessidades de 95% da população. Portanto, os valores de referência ou recomendados são estabelecidos como a necessidade média + 2 × DP e, desse modo, atendem ou ultrapassam as necessidades de 97,5% da população.

Os valores de referência e recomendados de ingestão de vitaminas e minerais publicados por diferentes autoridades nacionais e internacionais (**Tabelas 44-1** a **44-4**) diferem em virtude das diferentes interpretações dos dados disponíveis e da disponibilidade de novos dados experimentais em publicações mais recentes.

AS VITAMINAS FORMAM UM GRUPO DISTINTO DE COMPOSTOS COM UMA VARIEDADE DE FUNÇÕES METABÓLICAS

Uma vitamina é definida como um composto orgânico que é necessário na dieta em quantidades pequenas para a manutenção da integridade metabólica normal. A deficiência provoca uma doença específica, que é curada ou evitada apenas pela reposição da vitamina na dieta (**Tabela 44-5**). Todavia, a **vitamina D**, que é sintetizada na pele a partir do 7-desidrocolesterol com exposição à luz solar, e a **niacina**, que pode ser produzida a partir do aminoácido essencial triptofano, não obedecem estritamente a essa definição.

VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS

DOIS GRUPOS DE COMPOSTOS APRESENTAM ATIVIDADE DE VITAMINA A

Os retinoides compreendem o **retinol**, **o retinaldeído** e o **ácido retinoico** (vitamina A pré-formada, encontrada apenas em alimentos de origem animal); os carotenoides, encontrados nos vegetais, são constituídos pelos carotenos e compostos relacionados; muitos são precursores da vitamina A, já que podem ser clivados para produzir retinaldeído e, em seguida, retinol e ácido retinoico (**Figura 44-1**). Do ponto de vista quantitativo, os α-, β- e γ-carotenos e a criptoxantina constituem os carotenoides da provitamina A mais importantes. O β-caroteno e outros carotenoides da provitamina A são clivados na mucosa intestinal pela

TABELA 44-1 Valores de referência de ingestão de nutrientes: vitaminas e minerais, Reino Unido, 1991

Idade	Vit B_1 (mg)	Vit B_2 (mg)	Niacina (mg)	Vit B_6 (mg)	Vit B_{12} (μg)	Folato (μg)	Vit C (mg)	Vit A (μg)	Vit D (μg)	Ca (mg)	P (mg)	Mg (mg)	Fe (mg)	Zn (mg)	Cu (mg)	Se (μg)	I (μg)
0 a 3 meses	0,2	0,4	3	0,2	0,3	50	25	350	8,5	525	400	55	1,7	4,0	0,2	10	50
4 a 6 meses	0,2	0,4	3	0,2	0,3	50	25	350	8,5	525	400	60	4,3	4,0	0,3	13	60
7 a 9 meses	0,2	0,4	4	0,3	0,4	50	25	350	7	525	400	75	7,8	5,0	0,3	10	60
10 a 12 meses	0,3	0,4	5	0,4	0,4	50	25	350	7	525	400	80	7,8	5,0	0,3	10	60
1 a 3 anos	0,5	0,6	8	0,7	0,5	70	30	400	7	350	270	85	6,9	5,0	0,4	15	70
4 a 6 anos	0,7	0,8	11	0,9	0,8	100	30	500	–	450	350	120	6,1	6,5	0,6	20	100
7 a 10 anos	0,7	1,0	12	1,0	1,0	150	30	500	–	550	450	200	8,7	7,0	0,7	30	110
Homens																	
11 a 14 anos	0,9	1,2	15	1,2	1,2	200	35	600	–	1.000	775	280	11,3	9,0	0,8	45	130
15 a 18 anos	1,1	1,3	18	1,5	1,5	200	40	700	–	1.000	775	300	11,3	9,5	1,0	70	140
19 a 50 anos	1,0	1,3	17	1,4	1,5	200	40	700	–	700	550	300	8,7	9,5	1,2	75	140
50 + anos	0,9	1,3	16	1,4	1,5	200	40	700	10	700	550	300	8,7	9,5	1,2	75	140
Mulheres																	
11 a 14 anos	0,7	1,1	12	1,0	1,2	200	35	600	–	800	625	280	14,8	9,0	0,8	45	130
15 a 18 anos	0,8	1,1	14	1,2	1,5	200	40	600	–	800	6.254	300	14,8	7,0	1,0	60	140
19 a 50 anos	0,8	1,1	13	1,2	1,5	200	40	600	–	700	550	270	14,8	7,0	1,2	60	140
50 + anos	0,8	1,1	12	1,2	1,5	200	40	600	10	700	550	270	8,7	7,0	1,2	60	140
Gestantes	+0,1	+0,3	–	–	–	+100	+10	+100	10	–	–	–					
Em fase de lactação	+0,1	+0,5	+2	–	+0,5	+60	+30	+350	10	+550	+440	+50		+6,0	+0,3	+15	

Fonte: Department of Health. *Dietary Reference Values for Food Energy and Nutrients for the United Kingdom*. HMSO, Londres, 1991.

caroteno-dioxigenase, produzindo retinaldeído, que é reduzido a retinol, esterificado e secretado em quilomícrons, juntamente com ésteres formados a partir do retinol da dieta. A atividade intestinal da caroteno-dioxigenase é baixa, de modo que uma proporção relativamente grande do β-caroteno ingerido pode aparecer na circulação em sua forma inalterada. Embora o principal sítio de ação da caroteno-dioxigenase seja a ligação central do β-caroteno, pode ocorrer também clivagem assimétrica, levando à formação de 8′-, 10′- e 12′-apocarotenais, que são oxidados em ácido retinoico, mas que não podem ser utilizados como fontes de retinol ou de retinaldeído.

Embora possa parecer que uma molécula de β-caroteno deve produzir duas moléculas de retinol, isso não ocorre na prática; 6 μg de β-caroteno é equivalente a 1 μg de retinol pré-formado. Desse modo, a quantidade total de vitamina A presente nos alimentos é expressa em microgramas de equivalentes de retinol = μg de vitamina A pré-formada A + 1/6 × μg de β-caroteno + 1/12 × μg de outros carotenoides de provitamina A. Antes da disponibilidade de vitamina A pura para a análise química, o teor de vitamina A dos alimentos era determinado por ensaio biológico, e os resultados eram expressos em unidades internacionais (ui). Uma ui = 0,3 μg de retinol; 1 μg de retinol = 3,33 ui. Apesar de obsoleta, a ui é ainda usada algumas vezes em rótulos de alimentos. Em 2001, o relatório dos Valores de Referência Dietéticos dos EUA/Canadá introduziram o termo *equivalente de atividade de retinol* para levar em consideração a absorção incompleta e o metabolismo dos carotenoides; 1 RAE = 1 μg de holo-*trans*-retinol, 12 μg de β-caroteno, 24 μg de α-caroteno ou β-criptoxantina. Nessa base, uma ui de atividade de vitamina A é igual a 3,6 μg de β-caroteno ou a 7,2 μg de outros carotenoides provitamínicos A.

A vitamina A desempenha uma função na visão

Na retina, o retinaldeído atua como grupo prostético das proteínas opsinas fotossensíveis, formando a **rodopsina** (nos bastonetes) e a **iodopsina** (nos cones). Qualquer célula cone contém apenas um tipo de opsina e é sensível a apenas uma cor. No epitélio pigmentar da retina, o todo-*trans*-retinol é isomerizado em 11-*cis*-retinol e oxidado em 11-*cis*-retinaldeído. Este reage com um resíduo de lisina da opsina, formando uma holoproteína, a rodopsina. Conforme ilustrado na **Figura 44-2**, a absorção da luz pela rodopsina provoca isomerização do retinaldeído da forma 11-*cis* para todo-*trans*, bem como uma mudança de conformação da opsina. Isso leva à liberação do retinaldeído da proteína e à geração de um impulso nervoso. A produção da forma inicial excitada da rodopsina, a batorrodopsina, ocorre em picossegundos de iluminação. Em seguida, há uma série de mudanças de conformação, que levam à formação da metarrodopsina II, a qual desencadeia uma cascata de amplificação de nucleotídeo guanina e, em seguida, um impulso nervoso. A etapa final consiste em hidrólise para liberar o todo-*trans*-retinaldeído e a opsina. O elemento-chave para iniciar o ciclo visual é a disponibilidade de 11-*cis*-retinaldeído, e, portanto, de vitamina A. Na presença de deficiência, ocorre comprometimento do tempo necessário para a adaptação à escuridão, bem como da capacidade de enxergar em condições de pouca iluminação.

O ácido retinoico desempenha um papel na regulação da expressão dos genes e na diferenciação tecidual

Uma importante função da vitamina A consiste no controle da diferenciação e renovação celulares. Os ácidos todo-*trans*-retinoico

TABELA 44-2 Valores de referência de ingestão de vitaminas e minerais na população, União Europeia, 1993

Idade	Vit A (μg)	Vit B_1 (mg)	Vit B_2 (mg)	Niacina (mg)	Vit B_6 (mg)	Folato (μg)	Vit B_{12} (μg)	Vit C (mg)	Ca (mg)	P (mg)	Fe (mg)	Zn (mg)	Cu (mg)	Se (μg)	I (μg)
6 a12 meses	350	0,3	0,4	5	0,4	50	0,5	20	400	300	6	4	0,3	8	50
1 a 3 anos	400	0,5	0,8	9	0,7	100	0,7	25	400	300	4	4	0,4	10	70
4 a 6 anos	400	0,7	1,0	11	0,9	130	0,9	25	450	350	4	6	0,6	15	90
7 a 10 anos	500	0,8	1,2	13	1,1	150	1,0	30	550	450	6	7	0,7	25	100
Homens															
11 a 14 anos	600	1,0	1,4	15	1,3	180	1,3	35	1.000	775	10	9	0,8	35	120
15 a 17 anos	700	1,2	1,6	18	1,5	200	1,4	40	1.000	775	13	9	1,0	45	130
+ de 18 anos	700	1,1	1,6	18	1,5	200	1,4	45	700	550	9	9,5	1,1	55	130
Mulheres															
11 a 14 anos	600	0,9	1,2	14	1,1	180	1,3	35	800	625	18	9	0,8	35	120
15 a 17 anos	600	0,9	1,3	14	1,1	200	1,4	40	800	625	17	7	1,0	45	130
+ de 18 anos	600	0,9	1,3	14	1,1	200	1,4	45	700	550	16[1]	7	1,1	55	130
Gestante	700	1,0	1,6	14	1,3	400	1,6	55	700	550	[1]	7	1,1	55	130
Em fase de lactação	950	1,1	1,7	16	1,4	350	1,9	70	1.200	950	16	12	1,4	70	160

Fonte: Scientific Committee for Food *Nutrient and energy intakes for the European Community,* Commission of the European Communities, Luxemburgo, 1993.

e 9-*cis*-retinoico (Figura 44-1) regulam o crescimento, o desenvolvimento e a diferenciação dos tecidos, porém exercem distintas ações em tecidos diferentes. À semelhança dos hormônios tireoidianos e esteroides e da vitamina D, o ácido retinoico liga-se a receptores nucleares, que se ligam aos elementos de resposta do DNA e regulam a transcrição de genes específicos. Existem duas famílias de receptores retinoides nucleares: os receptores do ácido retinoico (RAR) ligam-se ao ácido todo-*trans*-retinoico ou ao ácido 9-*cis*-retinoico, enquanto os receptores X retinoides (RXR) ligam-se ao ácido 9-*cis*-retinoico. Os receptores X retinoides também formam dímeros com receptores da vitamina D, dos hormônios tireoidianos e outros receptores hormonais de ação nuclear. A deficiência de vitamina A compromete a função da vitamina D, devido à falta de ácido 9-*cis*-retinoico para formar dímeros dos receptores, enquanto o excesso de vitamina A também compromete a função da vitamina D, devido à formação de homodímeros de RXR, de modo que não há uma quantidade suficiente de RXR disponível para formar heterodímeros com o receptor da vitamina D.

A deficiência de vitamina A representa um importante problema mundial de saúde pública

A deficiência de vitamina A constitui a causa mais importante de cegueira evitável. O primeiro sinal de deficiência consiste em uma perda de sensibilidade à luz verde, seguida de comprometimento da adaptação a condições de baixa iluminação, seguido de cegueira noturna. A deficiência mais prolongada causa **xeroftalmia**, isto é, a queratinização da córnea e cegueira. A vitamina A também desempenha um importante papel na diferenciação das células do sistema imune, e até mesmo a presença de deficiência leve resulta em aumento da suscetibilidade a doenças infecciosas. Além disso, a síntese da proteína de ligação do retinol é reduzida em resposta à infecção (trata-se de uma **proteína de fase aguda** negativa), diminuindo a concentração circulante da vitamina e comprometendo ainda mais as respostas imunes.

TABELA 44-3 Ingestão dietética recomendada e ingestão aceitável de vitaminas e minerais, EUA e Canadá, 1997 a 2001

Idade	Vit A (μg)	Vit D (μg)	Vit E (mg)	Vit K (μg)	Vit B_1 (mg)	Vit B_2 (mg)	Niacina (mg)	Vit B_6 (mg)	Folato (μg)	Vit B_{12} (μg)	Vit C (mg)	Ca (mg)	P (mg)	Fe (mg)	Zn (mg)	Cu (mg)	Se (μg)	I (μg)
0 a 6 meses	400	5	4	2,0	0,2	0,3	2	0,1	65	0,4	40	210	100	–	2,0	200	15	110
7 a 12 meses	500	5	5	2,5	0,3	0,4	4	0,3	80	0,5	50	270	275	11	3	220	20	130
1 a 3 anos	300	5	6	30	0,5	0,5	6	0,5	150	0,9	15	500	460	7	3	340	20	90
4 a 8 anos	400	5	7	55	0,5	0,6	8	0,6	200	1,2	25	800	500	10	5	440	30	90
Homens																		
9 a 13 anos	600	5	11	60	0,9	0,9	12	1,0	300	1,8	45	1.300	1.250	8	8	700	40	120
14 a 18 anos	900	5	15	75	1,2	1,3	16	1,3	400	2,4	75	1.300	1.250	11	11	890	55	150
19 a 30 anos	900	5	15	120	1,2	1,3	16	1,3	400	2,4	90	1.000	700	8	11	900	55	150
31 a 50 anos	900	5	15	120	1,2	1,3	16	1,3	400	2,4	90	1.000	700	8	11	900	55	150
51 a 70 anos	900	10	15	120	1,2	1,3	16	1,7	400	2,4	90	1.200	700	8	11	900	55	150
> 70 anos	900	15	15	120	1,2	1,3	16	1,7	400	2,4	90	1.200	700	8	11	900	55	150
Mulheres																		
9 a 13 anos	600	5	11	60	0,9	0,9	12	1,0	300	1,8	45	1.300	1.250	8	8	700	40	120
14 a 18 anos	700	5	15	75	1,0	1,0	14	1,2	400	2,4	65	1.300	1.250	15	9	890	55	150
19 a 30 anos	700	5	15	90	1,1	1,1	14	1,3	400	2,4	75	1.000	700	18	8	900	55	150
31 a 50 anos	700	5	15	90	1,1	1,1	14	1,3	400	2,4	75	1.000	700	18	8	900	55	150
51 a 70 anos	700	10	15	90	1,1	1,1	14	1,5	400	2.4	75	1.200	700	8	8	900	55	150
> 70 anos	700	15	15	90	1,1	1,1	14	1,5	400	2,4	75	1.200	700	8	8	900	55	150
Gestantes	770	5	15	90	1,4	1,4	18	1,9	600	2,6	85	1.000	700	27	11	1.000	60	220
Em fase de lactação	900	5	16	90	1,4	1,6	17	2,0	500	2,8	120	1.000	700	9	12	1.300	70	290

(Os valores para lactentes com menos de 12 meses de idade constituem uma ingestão adequada, com base na ingestão média observada de lactentes alimentados principalmente com leite materno; para outros nutrientes além da vitamina K, os valores são RDA, com base na necessidade média estimada + 2 DP; os valores para a vitamina K constituem uma ingestão adequada, com base na ingestão média observada.)

Fonte: Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine Dietary Reference Intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D and fluoride, 1997; dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B_6, folate, vitamin B_{12}, pantothenic acid, biotin and choline, 1998; dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids, 2000; dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc, 2001, National Academy Press, Washington DC.

A vitamina A em excesso é tóxica

A capacidade de metabolizar a vitamina A é limitada, e a sua ingestão em excesso leva ao acúmulo da vitamina além da capacidade das proteínas de ligação, de modo que a vitamina A livre provoca lesão tecidual. Os sintomas de toxicidade afetam o sistema nervoso central (cefaleia, náusea, ataxia e anorexia, que são causadas pela elevação da pressão do líquido cerebrospinal); o fígado (hepatomegalia com alterações histológicas e hiperlipidemia); a homeostasia do cálcio (espessamento dos ossos longos, hipercalcemia e calcificação dos tecidos moles); e a pele (ressecamento excessivo, descamação e alopecia).

A VITAMINA D É, DE FATO, UM HORMÔNIO

A vitamina D não é estritamente uma vitamina, uma vez que ela pode ser sintetizada na pele, e, na maioria das condições, esta constitui a principal fonte da vitamina. Somente quando a exposição à luz solar é inadequada é que surge a necessidade de uma fonte dietética. A principal função da vitamina D consiste na regulação da absorção e homeostasia do cálcio; a maior parte de suas ações é mediada por receptores nucleares, que regulam a expressão de genes. Além disso, desempenha um papel na regulação da proliferação e diferenciação celulares. Há evidências de que uma ingestão consideravelmente acima dos valores necessários para manter a homeostasia do cálcio reduz o risco de resistência à insulina, obesidade e síndrome metabólica, bem como o risco de vários tipos de câncer. A deficiência, que provoca raquitismo em crianças e osteomalacia em adultos, continua sendo um problema nas latitudes setentrionais, onde a exposição à luz solar é inadequada.

A vitamina D é sintetizada na pele

O 7-desidrocolesterol (um intermediário na síntese do colesterol que se acumula na pele) sofre uma reação não enzimática com a exposição à luz ultravioleta, produzindo a pré-vitamina D (**Figura 44-3**). No decorrer de um período de várias horas, este último composto sofre uma reação adicional para formar o colecalciferol, sendo absorvido para a corrente sanguínea. Nos climas temperados, a concentração plasmática de vitamina D apresenta-se mais elevada no final do verão e mais baixa no final do inverno. Acima de latitudes em torno de 40° ao norte ou ao sul, existe, no inverno, pouquíssima radiação ultravioleta com comprimento de onda apropriado.

A vitamina D é metabolizada em seu metabólito ativo, o calcitriol, no fígado e nos rins

O colecalciferol, que é sintetizado na pele ou obtido dos alimentos, sofre duas hidroxilações para produzir o metabólito ativo, a 1,25-di-hidroxivitamina D ou calcitriol (**Figura 44-4**). O ergo-

TABELA 44-4 Ingestão recomendada de nutrientes para vitaminas, FAO 2001

Idade	Vit A (μg)	Vit D (μg)	Vit K (μg)	Vit B_1 (mg)	Vit B_2 (mg)	Niacina (mg)	Vit B_6 (mg)	Folato (μg)	Vit B_{12} (μg)	Vit C (mg)	Panto (mg)	Biotina (μg)
0 a 6 meses	375	5	5	0,2	0,3	2	0,1	80	0,4	25	1,7	5
7 a 12 meses	400	5	10	0,3	0,4	4	0,3	80	0,5	30	1,8	6
1 a 3 anos	400	5	15	0,5	0,5	6	0,5	160	0,9	30	2,0	8
4 a 6 anos	450	5	20	0,6	0,6	8	0,6	200	1,2	30	3,0	12
7 a 9 anos	500	5	25	0,9	0,9	12	1,0	300	1,8	35	4,0	20
Homens												
10 a 18 anos	600	5	35 a 55	1,2	1,3	16	1,3	400	2,4	40	5,0	30
19 a 50 anos	600	5	65	1,2	1,3	16	1,3	400	2,4	45	5,0	30
50 a 65 anos	600	10	65	1,2	1,3	16	1,7	400	2,4	45	5,0	30
> 65 anos	600	15	65	1,2	1,3	16	1,7	400	2,4	45	5,0	30
Mulheres												
10 a 18 anos	600	5	35 a 55	1,1	1,0	16	1,2	400	2,4	40	5,0	25
19 a 50 anos	600	5	55	1,1	1,1	14	1,3	400	2,4	45	5,0	30
50 a 65 anos	600	10	55	1,1	1,1	14	1,5	400	2,4	45	5,0	30
> 65 anos	600	15	55	1,1	1,1	14	1,5	400	2,4	45	5,0	30
Gestantes	800	5	55	1,4	1,4	18	1,9	600	2,6	55	6,0	30
Em fase de lactação	850	5	55	1,5	1,6	17	2,0	500	2,8	70	7,0	35

Fonte: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, *Human Vitamin and Mineral Requirements,* FAO, 2001.

TABELA 44-5 As vitaminas

Vitamina		Funções	Doença por deficiência
Lipossolúveis			
A	Retinol, β-caroteno	Pigmentos visuais da retina; regulação da expressão dos genes e diferenciação celular (o β-caroteno é um antioxidante)	Cegueira noturna; xeroftalmia; queratinização da pele
D	Calciferol	Manutenção do equilíbrio do cálcio; aumenta a absorção intestinal do Ca^{2+} e mobiliza o mineral ósseo; regulação da expressão dos genes e da diferenciação celular	Raquitismo = mineralização deficiente do osso; osteomalacia = desmineralização do osso
E	Tocoferóis, tocotrienóis	Antioxidante, particularmente nas membranas celulares; funções na sinalização celular	Extremamente rara – disfunção neurológica grave
K	Filoquinona: menaquinonas	Coenzima na formação do γ-carboxiglutamato em enzimas da coagulação sanguínea e da matriz óssea	Comprometimento da coagulação sanguínea, doença hemorrágica
Hidrossolúveis			
B_1	Tiamina	Coenzima das piruvato e α-cetoglutarato desidrogenases e transcetolase; regula o canal de Cl^- na condução nervosa	Lesão dos nervos periféricos (beribéri) ou lesão do sistema nervoso central (síndrome de Wernicke-Korsakoff)
B_2	Riboflavina	Coenzima nas reações de oxidação e redução (FAD e FMN); grupo prostético das flavoproteínas	Lesões das extremidades da boca, dos lábios e da língua, dermatite seborreica
Niacina	Ácido nicotínico, nicotinamida	Coenzima das reações de oxidação e redução; parte funcional do NAD e do NADP; desempenha um papel na regulação do cálcio intracelular e na sinalização celular	Pelagra – dermatite fotossensível, psicose depressiva
B_6	Piridoxina, piridoxal, piridoxamina	Coenzima na transaminação e na descarboxilação dos aminoácidos e da glicogênio fosforilase; modula a ação dos hormônios esteroides	Distúrbios do metabolismo dos aminoácidos, convulsões
	Ácido fólico	Coenzima na transferência de fragmentos de um carbono	Anemia megaloblástica
B_{12}	Cobalamina	Coenzima na transferência de um carbono e no metabolismo do ácido fólico	Anemia perniciosa = anemia megaloblástica com degeneração da medula espinal
	Ácido pantotênico	Parte funcional da CoA e da proteína carreadora de acil: síntese e metabolismo dos ácidos graxos	Lesão dos nervos periféricos (melalgia nutricional ou "síndrome de ardor nos pés")
H	Biotina	Coenzima nas reações de carboxilação da gliconeogênese e síntese dos ácidos graxos; desempenha um papel na regulação do ciclo celular	Comprometimento do metabolismo das gorduras e dos carboidratos; dermatite
C	Ácido ascórbico	Coenzima na hidroxilação da prolina e da lisina na síntese do colágeno; antioxidante; aumenta a absorção do ferro	Escorbuto – cicatrização deficiente de feridas, perda do cemento dentário, hemorragia subcutânea

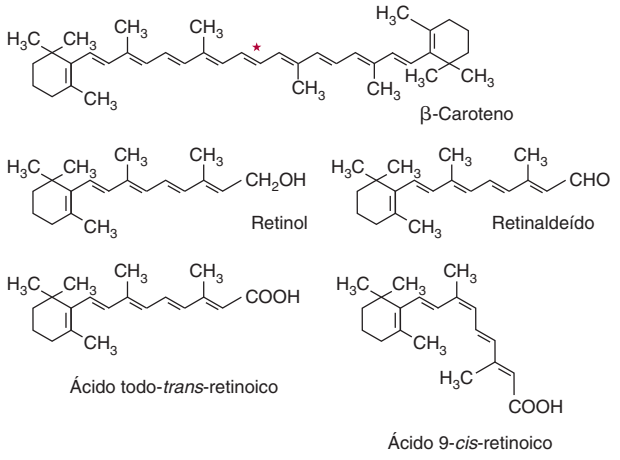


FIGURA 44-1 β-caroteno e os principais vitâmeros da vitamina A. O asterisco mostra o sítio de clivagem do β-caroteno pela caroteno-dioxigenase, produzindo o retinaldeído.

calciferol proveniente de alimentos enriquecidos sofre uma hidroxilação semelhante para produzir o ercalcitriol. No fígado, o colecalciferol é hidroxilado para formar o derivado 25-hidroxi, o calcidiol. Este composto é liberado na circulação ligado a uma globulina de ligação da vitamina D, que constitui a principal forma de armazenamento da vitamina. Nos rins, o calcidiol sofre uma 1-hidroxilação, produzindo o metabólito ativo, a 1,25-di-hidroxivitamina D (calcitriol), ou uma 24-hidroxilação, gerando um metabólito provavelmente inativo, a di-hidroxivitamina D (24-hidroxicalcidiol).

O metabolismo da vitamina D é regulado pela homeostasia do cálcio e regula a própria homeostasia do cálcio

A principal função da vitamina D consiste em controlar a homeostasia do cálcio e, por sua vez, o metabolismo desta vitamina é regulado por fatores que respondem às concentrações plasmá-

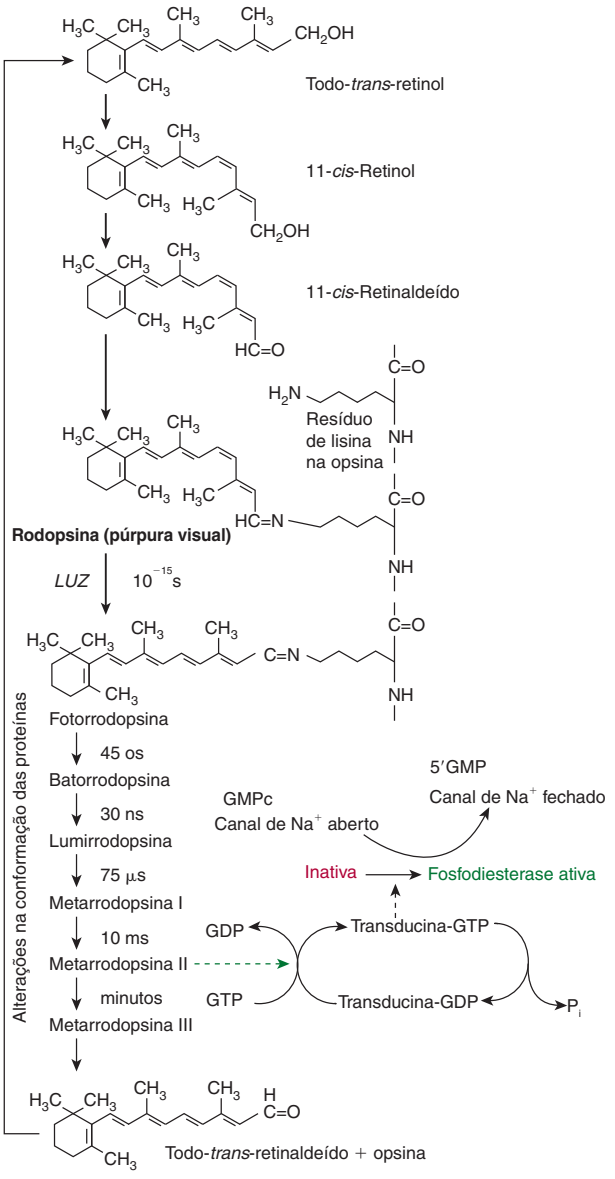


FIGURA 44-2 O papel do retinaldeído no ciclo visual.

ticas de cálcio e de fosfato. O calcitriol atua para reduzir a sua própria síntese ao induzir a 24-hidroxilase e ao reprimir a 1-hidroxilase nos rins. A principal função da vitamina D consiste em manter a concentração plasmática de cálcio. O calcitriol exerce esse efeito de três maneiras: aumentando a absorção intestinal de cálcio; reduzindo a excreção de cálcio (por meio da estimulação de sua reabsorção nos túbulos renais distais); e mobilizando o mineral ósseo. Além disso, o calcitriol está envolvido na secreção de insulina, na síntese e na secreção do paratormônio e dos hormônios tireoidianos, na inibição da síntese de interleucinas pelos linfócitos ativados e das imunoglobulinas pelos linfócitos T ativados, na diferenciação das células precursoras dos monócitos, e na modulação da proliferação celular. Na maioria dessas ações, o calcitriol age como um hormônio esteroide, ligando-se aos receptores nucleares e aumentando a expressão de genes, embora também exerça efeitos rápidos sobre os transportadores de cálcio na mucosa intestinal. Para mais detalhes sobre o papel do calcitriol na homeostasia do cálcio, ver o Capítulo 47.

Ingestões maiores de vitamina D podem ser benéficas

Há evidências crescentes de que um nível maior de vitamina D proporciona proteção contra vários tipos de câncer, incluindo câncer de próstata e câncer colorretal, bem como contra o pré-diabetes e a síndrome metabólica. Os níveis desejáveis de ingestão podem ser consideravelmente mais altos do que os valores atuais de referência e certamente não podem ser obtidos de alimentos não enriquecidos. Embora a exposição aumentada à luz solar satisfaça a necessidade, ela está associada ao risco de desenvolvimento de câncer de pele.

A deficiência de vitamina D acomete crianças e adultos

No **raquitismo**, doença causada pela deficiência de vitamina D, os ossos de crianças apresentam mineralização deficiente devido à pouca absorção de cálcio. Ocorrem problemas semelhantes em consequência da deficiência observada durante o crescimento na puberdade. Nos adultos, a **osteomalacia** resulta da desmineralização do osso, particularmente em mulheres com pouca exposição à luz solar, especialmente depois de várias gestações. Embora a vitamina D seja essencial para o tratamento e a prevenção da osteomalacia no idoso, há poucas evidências de que seja benéfica no tratamento da **osteoporose**.

A vitamina D em quantidades excessivas é tóxica

Alguns lactentes são sensíveis a uma ingestão de 50 μg/dia de vitamina D, resultando em concentrações plasmáticas elevadas de cálcio. Isso pode levar à contração dos vasos sanguíneos, hipertensão arterial e **calcinose** – isto é, a calcificação dos tecidos moles. Embora a vitamina D obtida na dieta em excesso seja tóxica, a exposição excessiva à luz solar não resulta em intoxicação por esta vitamina, devido à capacidade limitada de sintetizar o precursor, o 7-desidrocolesterol, e visto que a exposição prolongada da pré-vitamina D à luz solar leva à formação de compostos inativos.

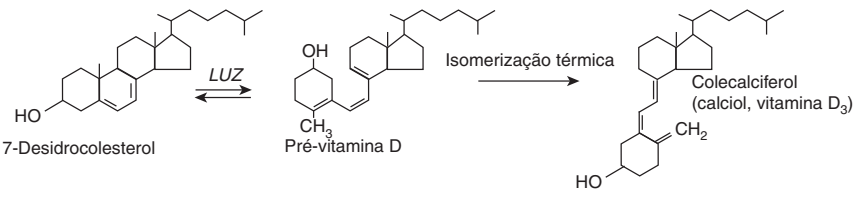


FIGURA 44-3 Síntese de vitamina D na pele.

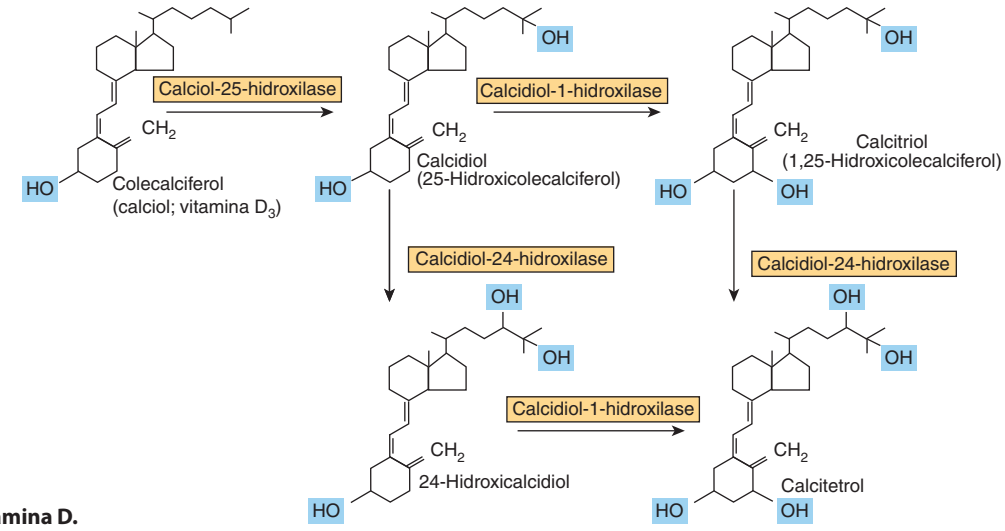


FIGURA 44-4 Metabolismo da vitamina D.

A VITAMINA E NÃO DESEMPENHA UMA FUNÇÃO METABÓLICA PRECISAMENTE DEFINIDA

Não foi definida nenhuma função singular inequívoca para a vitamina E. A vitamina E atua como **antioxidante** lipossolúvel nas membranas celulares, onde muitas de suas funções podem ser desempenhadas por antioxidantes sintéticos. É importante na manutenção da fluidez das membranas celulares. Além disso, desempenha um papel (relativamente pouco definido) na sinalização celular. A vitamina E é o descritor genérico para duas famílias de compostos: os **tocoferóis** e os **tocotrienóis** (**Figura 44-5**). Os diferentes vitâmeros têm potências biológicas distintas; o mais ativo é o D-α-tocoferol, e a ingestão de vitamina E é muitas vezes expressa em termos de miligramas de equivalentes de D-α-tocoferol. O DL-α-tocoferol sintético não apresenta a mesma potência biológica do composto natural.

A vitamina E é o principal antioxidante lipossolúvel das membranas celulares e lipoproteínas plasmáticas

A principal função da vitamina E consiste em atuar como antioxidante que termina com reações em cadeia e sequestra os radicais livres nas membranas celulares e lipoproteínas plasmáticas, reagindo com os radicais de peróxidos lipídicos formados pela peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados (Capítulo 45). O produto radical tocoferoxila é relativamente não reativo e acaba formando compostos sem radicais. Em geral, o radical tocoferoxila é novamente reduzido a tocoferol por meio de sua reação com a vitamina C do plasma (**Figura 44-6**). Em seguida, o radical monodesidroascorbato resultante sofre reação enzimática ou não enzimática para produzir ascorbato e desidroascorbato, os quais não são radicais.

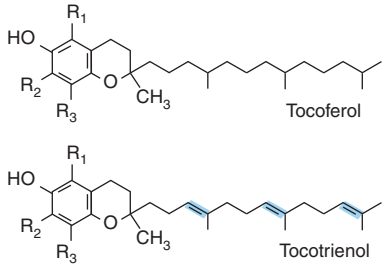


FIGURA 44-5 Vitâmeros da vitamina E. No α-tocoferol e no tocotrienol, o R_1, o R_2 e o R_3 são grupos $-CH_3$. Nos β-vitâmeros, R_2 é H, nos γ-vitâmeros, R_1 é H e nos δ-vitâmeros, tanto R_1 quanto R_2 são H.

Deficiência de vitamina E

Nos animais de laboratório, a deficiência de vitamina E resulta em reabsorção dos fetos e em atrofia testicular. Nos seres humanos, a deficiência na dieta de vitamina E é desconhecida, embora pacientes com má absorção grave de gordura, fibrose cística e alguns tipos de doença hepática crônica tenham deficiência, uma vez que são incapazes de absorver a vitamina ou de transportá-la, apresentando lesão das membranas neurais e musculares. Os lactentes prematuros nascem com reservas inadequadas da vitamina. As membranas eritrocitárias são anormalmente frágeis devido à peroxidação dos lipídeos, resultando em anemia hemolítica.

A VITAMINA K É NECESSÁRIA PARA A SÍNTESE DAS PROTEÍNAS DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

A vitamina K foi descoberta em consequência de pesquisas sobre a causa de um distúrbio hemorrágico, conhecido como doença hemorrágica (do trevo doce) do gado e de aves alimentadas com dieta sem gorduras. O fator ausente da dieta das galinhas era a vitamina K, enquanto a ração do gado continha **dicumarol**, um antagonista da vitamina. Os antagonistas da vitamina K são utilizados para reduzir a coagulação sanguínea em pacientes com risco de trombose; o mais amplamente usado é a **varfarina**.

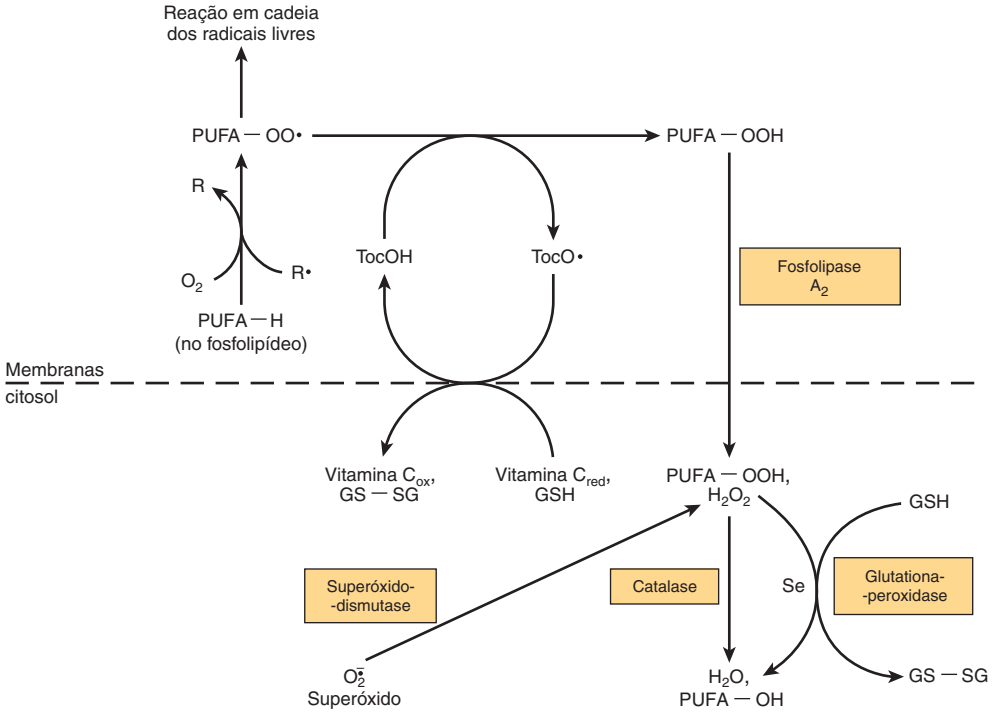


FIGURA 44-6 Interação entre os antioxidantes na fase lipídica (membranas celulares) e fase aquosa (citosol). (R•, radical livre; PUFA-OO•, radical peroxila do ácido graxo poli-insaturado no fosfolipídeo da membrana; PUFA-OOH, ácido graxo hidroxiperoxi poli-insaturado no fosfolipídeo da membrana, liberado no citosol como ácido graxo hidroxiperoxi poli-insaturado pela ação da fosfolipase A_2; PUFA-OH, ácido graxo hidroxi poli-insaturado; Toc-OH vitamina E [α-tocoferol]; TocO•, radical tocoferoxila; Se, selênio; GSH, glutationa reduzida; GS-SG, glutationa oxidada, que é reduzida a GSH após reação com o NADPH, catalisada pela glutationa-redutase; PUFA-H, ácido graxo poli-insaturado.)

Três compostos possuem a atividade biológica da vitamina K (**Figura 44-7**): a **filoquinona**, a fonte dietética normal encontrada nos vegetais folhosos verdes; as **menaquinonas**, sintetizadas pelas bactérias intestinais, com cadeias laterais de comprimentos diferentes; e a **menadiona** e o diacetato de menadiol, compostos sintéticos que podem ser metabolizados em filoquinona. As menaquinonas são absorvidas em certo grau, porém ainda não foi esclarecido até que ponto elas são biologicamente ativas, visto que é possível induzir sinais de deficiência da vitamina K simplesmente pela ingestão de uma dieta deficiente em filaquinona, sem inibir a ação das bactérias intestinais.

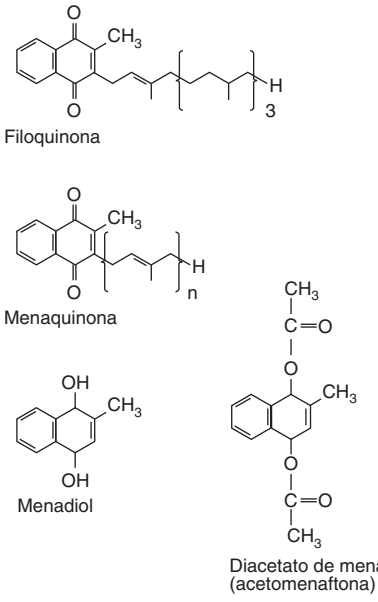


FIGURA 44-7 Vitâmeros da vitamina K. O menadiol (ou menadiona) e o diacetato de menadiol são compostos sintéticos que são convertidos em menaquinona no fígado.

A vitamina K é a coenzima da carboxilação do glutamato na modificação pós-sintética das proteínas de ligação do cálcio

A vitamina K é o cofator para a carboxilação dos resíduos de glutamato na modificação pós-sintética das proteínas para formar o aminoácido incomum, denominado γ-carboxiglutamato (Gla) (**Figura 44-8**). Inicialmente, a hidroquinona da vitamina K é oxidada em epóxido, que ativa um resíduo de glutamato no substrato proteico para formar um carbânion, o qual reage de modo não enzimático com o dióxido de carbono para formar o γ-carboxiglutamato. O epóxido da vitamina K é reduzido a quinona por uma redutase sensível à varfarina, e a quinona é reduzida à hidroquinona ativa pela mesma redutase sensível à varfarina ou por uma quinona redutase insensível à varfarina. Na presença de varfarina, o epóxido da vitamina K não pode ser reduzido, porém acumula-se e é excretado. Se a dieta fornecer uma quantidade suficiente de vitamina K (na forma de quinona), ela poderá ser reduzida a hidroquinona ativa pela enzima insensível à varfarina, e a carboxilação poderá prosseguir com a utilização estequiométrica da vitamina K e excreção do epóxido. Uma alta dose de vitamina K funciona como antídoto para uma superdosagem de varfarina.

A protrombina e várias outras proteínas do sistema de coagulação sanguínea (fatores VII, IX e X, bem como proteínas C e S, Capítulo 50) contêm de 4 a 6 resíduos de γ-carboxiglutamato. O γ-carboxiglutamato efetua a quelação dos íons cálcio e, desse modo, possibilita a ligação das proteínas da coagulação

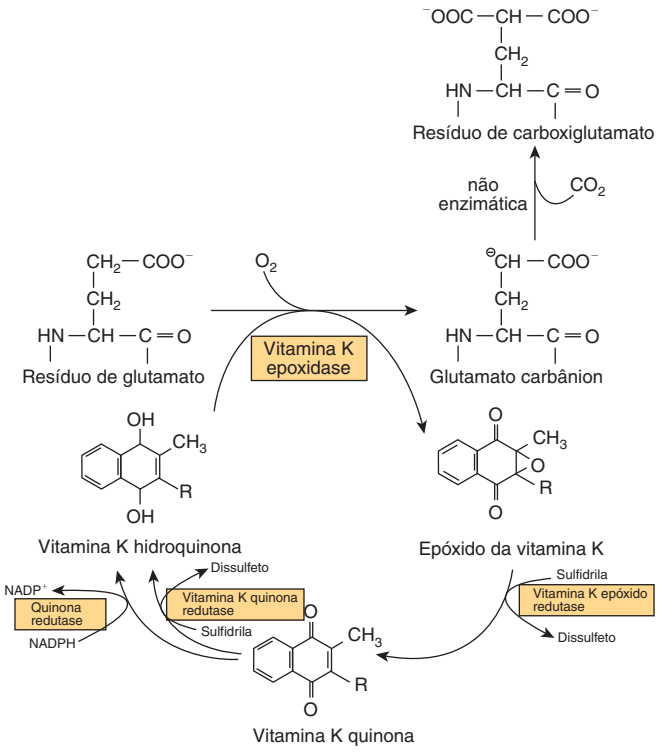


FIGURA 44-8 Papel da vitamina K na síntese do γ-carboxiglutamato.

sanguínea às membranas. Na deficiência de vitamina K ou na presença de varfarina, um precursor anormal da protrombina (pré-protrombina), que contém pouco ou nenhum γ-carboxiglutamato, sendo incapaz de quelar o cálcio, é liberado na circulação.

A vitamina K também é importante na síntese das proteínas do osso e outras proteínas de ligação do cálcio

Várias outras proteínas sofrem a mesma carboxilação dependente de vitamina K do glutamato a γ-carboxiglutamato, incluindo a osteocalcina e a proteína Gla da matriz do osso, a nefrocalcina nos rins e o produto do gene específico da parada de crescimento Gas6, que está envolvido tanto na regulação da diferenciação e desenvolvimento do sistema nervoso quanto no controle da apoptose em outros tecidos. Todas essas proteínas que contêm γ-carboxiglutamato ligam-se ao cálcio, o que provoca uma mudança de conformação, de modo que elas passam a interagir com fosfolipídeos da membrana. A liberação de osteocalcina na circulação fornece um indício do estado da vitamina D.

VITAMINAS HIDROSSOLÚVEIS

A VITAMINA B_1 (TIAMINA) DESEMPENHA UM PAPEL ESSENCIAL NO METABOLISMO DOS CARBOIDRATOS

A **tiamina** desempenha um papel central no metabolismo energético e, em particular, no metabolismo dos carboidratos (**Figura 44-9**). A **tiamina pirofosfato** é a coenzima de três complexos multienzimáticos que catalisam as reações de descarboxilação oxidativa: a piruvato-desidrogenase no metabolismo dos carboidratos (Capítulo 17), a α-cetoglutarato-desidrogenase no ciclo do ácido cítrico (Capítulo 17), e a desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada, envolvida no metabolismo da leucina, da isoleucina e da valina (Capítulo 29). Em todos os casos, a tiamina pirofosfato fornece um carbono reativo na fração tiazol que forma um carbânion, que, em seguida, contribui para o grupo carbonil, como, por exemplo, o piruvato. Em seguida, o composto de adição é descarboxilado, eliminando CO_2. A tiamina pirofosfato também é a coenzima da transcetolase na via das pentoses-fosfatos (Capítulo 21).

A tiamina trifosfato desempenha um papel na condução nervosa, visto que fosforila e, portanto, ativa um canal de cloreto na membrana das células nervosas.

A deficiência de tiamina afeta o sistema nervoso e o coração

A deficiência de tiamina pode resultar em três síndromes distintas: uma neurite periférica crônica, o **beribéri**, que pode ou não estar associado à **insuficiência cardíaca** e ao **edema**; o beribéri pernicioso agudo (fulminante) (beribéri *shoshin*), no qual predominam a insuficiência cardíaca e anormalidades metabólicas, sem neurite periférica; e a **encefalopatia de Wernicke** com **psicose de Korsakoff**, associada particularmente ao uso abusivo de álcool e de narcóticos. O papel da tiamina pirofosfato na piruvato-desidrogenase significa que, na deficiência, ocorre comprometimento da conversão do piruvato em acetil-CoA. Nos indivíduos que consomem uma dieta relativamente rica em carboidratos, isso resulta em aumento das concentrações plasmáticas de lactato e piruvato, podendo causar acidose lática potencialmente fatal.

O estado nutricional da tiamina pode ser avaliado pela ativação da transcetolase eritrocitária

A ativação da apo-transcetolase (proteína enzimática) em lisados de eritrócitos pela adição de tiamina pirofosfato *in vitro* tornou-se o índice aceito para o estado nutricional da tiamina.

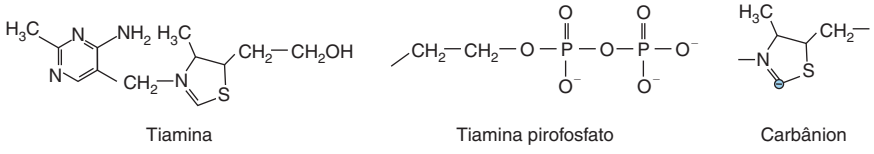


FIGURA 44-9 Tiamina, tiamina pirofosfato e a forma carbânion.

A VITAMINA B_2 (RIBOFLAVINA) DESEMPENHA UM PAPEL CENTRAL NO METABOLISMO ENERGÉTICO

A riboflavina fornece as frações reativas das coenzimas de **flavina mononucleotídeo** (**FMN**) e **flavina-adenina dinucleotídeo (FAD)** (**Figura 44-10**). A FMN é formada pela fosforilação dependente de ATP da riboflavina, enquanto o FAD é sintetizado pela reação subsequente com ATP, em que a fração AMP é transferida para o FMN. As principais fontes dietéticas de riboflavina são o leite e os laticínios. Além disso, em virtude de sua cor amarelo intensa, a riboflavina é amplamente usada como aditivo alimentar.

As coenzimas de flavina são carreadoras de elétrons nas reações de oxirredução

Incluem a cadeia respiratória mitocondrial, as enzimas-chave na oxidação dos ácidos graxos e dos aminoácidos e o ciclo do ácido cítrico. A reoxidação da flavina reduzida nas oxigenases e oxidases de função mista prossegue por meio da formação do radical flavina e da flavina hidroperóxido, com geração intermediária dos radicais superóxido e peridroxila e do peróxido de hidrogênio. Por esse motivo, as flavina-oxidases contribuem de modo significativo para o estresse oxidativo global do organismo (Capítulo 45).

A deficiência de riboflavina é disseminada, mas não é fatal

Embora a riboflavina esteja envolvida essencialmente no metabolismo dos lipídeos e dos carboidratos, e a sua deficiência ocorra em muitos países, o distúrbio não é fatal, devido à sua conservação muito eficiente nos tecidos. A riboflavina liberada pelo catabolismo das enzimas é rapidamente incorporada em enzimas recém-sintetizadas. A deficiência de riboflavina caracteriza-se por queilose, descamação e inflamação da língua, bem como por dermatite seborreica. O estado nutricional da riboflavina é avaliado pela determinação da ativação da glutationa redutase eritrocitária pela adição de FAD *in vitro*.

A NIACINA NÃO É ESTRITAMENTE UMA VITAMINA

A niacina foi descoberta como nutriente durante estudos sobre a **pelagra**. Não se trata estritamente de uma vitamina, uma vez que ela pode ser sintetizada no organismo a partir do aminoácido essencial, o triptofano. Dois compostos, o **ácido nicotínico** e a **nicotinamida**, possuem a atividade biológica da niacina, e a sua função metabólica ocorre na forma do anel de nicotinamida das coenzimas **NAD** e **NADP** nas reações de oxidação/redução (**Figura 44-11**). Cerca de 60 mg de triptofano equivalem a 1 mg de niacina dietética. O teor de niacina dos alimentos é expresso da seguinte maneira:

$$\text{equivalentes de niacina em mg} = \text{niacina pré-formada em mg} + 1/60 \times \text{mg triptofano}$$

Como a parte da niacina nos cereais não está biologicamente disponível, esse valor deve ser descontado.

O NAD constitui a fonte de ADP-ribose

Além de sua função como coenzima, o NAD constitui a fonte de ADP-ribose para a **ADP-ribosilação** das proteínas e poli-ADP-ribosilação das nucleoproteínas envolvidas no **mecanismo de reparo do DNA**. A ADP-ribose cíclica e a adenina dinucleotídeo do ácido nicotínico, formado a partir do NAD, atuam para aumentar o cálcio intracelular em resposta a neurotransmissores e hormônios.

A pelagra é causada pela deficiência de triptofano e de niacina

A pelagra caracteriza-se por dermatite fotossensível. À medida que a doença evolui, ocorre demência e, possivelmente, diarreia. A pelagra sem tratamento é fatal. Embora a etiologia nutricional da pelagra esteja bem estabelecida, e o triptofano ou a niacina evitem ou curem a doença, outros fatores, incluindo a deficiência de riboflavina ou de vitamina B_6, ambas as quais são necessárias para a síntese de nicotinamida a partir do triptofano, podem ser importantes. Na maioria dos surtos de pelagra, as mulheres são acometidas duas vezes mais do que os homens, provavelmente devido à inibição do metabolismo do triptofano pelos metabólitos dos estrogênios.

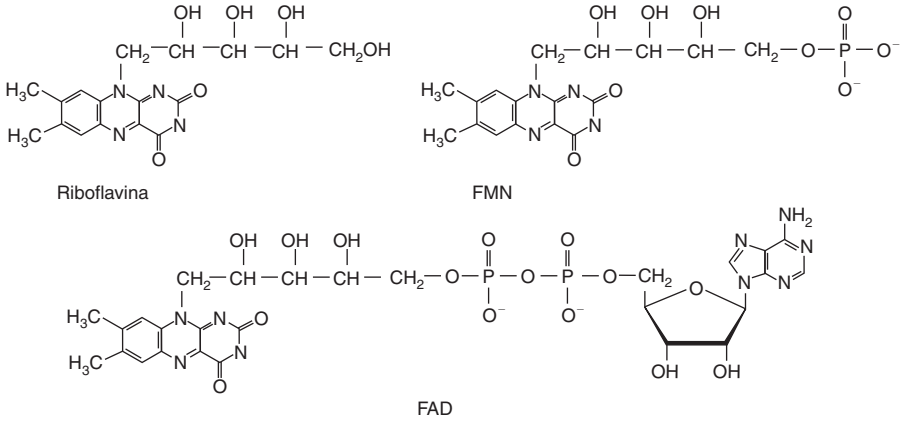


FIGURA 44-10 A riboflavina e as coenzimas flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina-adenina dinucleotídeo (FAD).

Niacina (ácido nicotínico e nicotinamida). Ver também Figura 7-2

FIGURA 44-11 Niacina (ácido nicotínico e nicotinamida).

A pelagra pode ocorrer em consequência de doença, apesar da ingestão adequada de triptofano e de niacina

Diversas doenças genéticas que resultam em defeitos do metabolismo do triptofano estão associadas ao desenvolvimento da pelagra, a despeito de uma ingestão aparentemente adequada de triptofano e niacina. A **doença de Hartnup** é um distúrbio genético raro, caracterizado por um defeito no mecanismo de transporte do triptofano na membrana, resultando em perdas pronunciadas em consequência de má absorção intestinal e falha do mecanismo de reabsorção renal. Na **síndrome carcinoide**, ocorrem metástases de um tumor hepático primário de células enterocromafins, que sintetizam a 5-hidroxitriptamina. A produção excessiva de 5-hidroxitriptamina pode ser responsável por até 60% do metabolismo corporal do triptofano, causando pelagra devido ao desvio desse composto da síntese do NAD.

A niacina em excesso é tóxica

O ácido nicotínico tem sido utilizado no tratamento da hiperlipidemia, quando há necessidade de uma quantidade da ordem de 1 a 6 g/dia, causando dilatação dos vasos sanguíneos e ruborização, juntamente com irritação cutânea. A ingestão de ácido nicotínico e de nicotinamida acima de 500 mg/dia também provoca lesão hepática.

A VITAMINA B_6 É IMPORTANTE NO METABOLISMO DOS AMINOÁCIDOS E DO GLICOGÊNIO, BEM COMO NA AÇÃO DOS HORMÔNIOS ESTEROIDES

Seis compostos exercem atividade de vitamina B_6 (**Figura 44-12**): a **piridoxina**, o **piridoxal**, a **piridoxamina** e seus 5′-fosfatos. A coenzima ativa é o piridoxal 5′-fosfato. Cerca de 80% da vitamina B_6 total no organismo consistem em piridoxal fosfato nos músculos, principalmente em associação com a glicogênio fosforilase. Esse composto não está disponível em situações de deficiência, porém é liberado em estado de inanição, quando ocorre depleção das reservas de glicogênio, e torna-se então disponível, particularmente no fígado e nos rins, para atender às necessidades aumentadas de gliconeogênese a partir dos aminoácidos.

A vitamina B_6 desempenha vários papéis no metabolismo

O piridoxal fosfato é uma coenzima para muitas enzimas envolvidas no metabolismo dos aminoácidos, particularmente na transaminação e descarboxilação. Atua também como cofator da glicogênio fosforilase, em que o grupo fosfato é cataliticamente importante. Além disso, a vitamina B_6 é importante na ação dos hormônios esteroides. O piridoxal fosfato remove o complexo hormônio-receptor de sua ligação ao DNA, interrompendo a ação dos hormônios. Na deficiência de vitamina B_6, ocorre aumento da sensibilidade às ações de baixas concentrações de estrogênios, androgênios, cortisol e vitamina D.

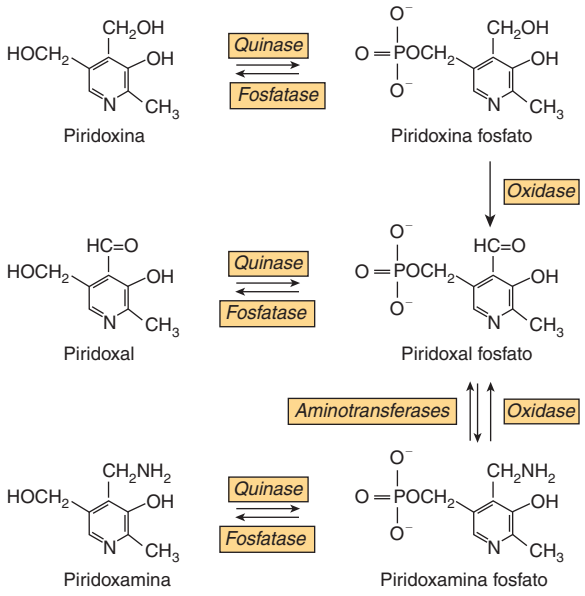


FIGURA 44-12 Interconversão dos vitâmeros da vitamina B_6.

A deficiência de vitamina B_6 é rara

Embora a doença clínica por deficiência seja rara, há evidências de que uma porcentagem significativa da população apresenta um estado marginal de vitamina B_6. A deficiência moderada resulta em anormalidades do metabolismo do triptofano e da metionina. O aumento da sensibilidade à ação dos hormônios esteroides pode ser importante no desenvolvimento do **câncer dependente de hormônio** de mama, útero e próstata, e o estado da vitamina B_6 pode influenciar o prognóstico.

O estado da vitamina B_6 é avaliado pelo ensaio das transaminases eritrocitárias

O método mais amplamente utilizado para avaliar o estado da vitamina B_6 consiste na ativação da transaminase eritrocitária pela adição de piridoxal fosfato *in vitro*, expresso como coeficiente de ativação.

A vitamina B_6 em excesso provoca neuropatia sensitiva

O desenvolvimento de neuropatia sensitiva foi descrito em pacientes em uso de 2 a 7 g de piridoxina por dia por uma variedade de motivos (há algumas evidências de que a piridoxina seja efetiva no tratamento da **síndrome pré-menstrual**). Ocorreu alguma lesão residual após a retirada dessas doses altas; outros relatos sugerem que o consumo de mais de 200 mg/dia esteja associado a lesão neurológica.

A VITAMINA B_{12} É ENCONTRADA APENAS EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL

O termo "vitamina B_{12}" é usado como descritor genérico das **cobalaminas** – os **corrinoides** (compostos contendo cobalto que possuem o anel corrina) que apresentam atividade biológica da vitamina (**Figura 44-13**). Alguns corrinoides que atuam como fatores de crescimento para microrganismos não apenas carecem de atividade de vitamina B_{12}, como também podem atuar como antimetabólitos da vitamina. Embora seja sintetizada exclusivamente pelos microrganismos, para fins práticos, a vitamina B_{12} só é encontrada em alimentos de origem animal, visto que não existem fontes vegetais dessa vitamina. Isso significa que os vegetarianos estritos (veganos) correm risco de desenvolver deficiência de vitamina B_{12}. As pequenas quantidades da vitamina produzidas pelas bactérias na superfície das frutas podem ser adequadas para atender às necessidades, porém dispor-se de preparações de vitamina B_{12} produzidas por fermentação bacteriana pode ser uma alternativa.

A absorção de vitamina B_{12} exige duas proteínas de ligação

A vitamina B_{12} é absorvida em sua forma ligada ao **fator intrínseco**, uma glicoproteína pequena secretada pelas células parietais da mucosa gástrica. O ácido gástrico e a pepsina liberam a vitamina de sua ligação à proteína no alimento e a tornam disponível para ligar-se à **cobalofilina**, uma proteína de ligação secretada na saliva. No duodeno, a cobalofilina é hidrolisada, liberando a vitamina B_{12} para a sua ligação ao fator intrínseco. Por esse motivo, a presença de **insuficiência pancreática** pode constituir um fator no desenvolvimento da deficiência da vitamina B_{12}, resultando na excreção da vitamina ligada à cobalofilina. O fator intrínseco liga-se apenas aos vitâmeros ativos da vitamina B_{12}, e não a outros corrinoides. A vitamina B_{12} é absorvida no terço distal do íleo por meio de receptores que se ligam ao complexo fator intrínseco da vitamina B_{12}, mas não ao fator intrínseco livre nem à vitamina livre.

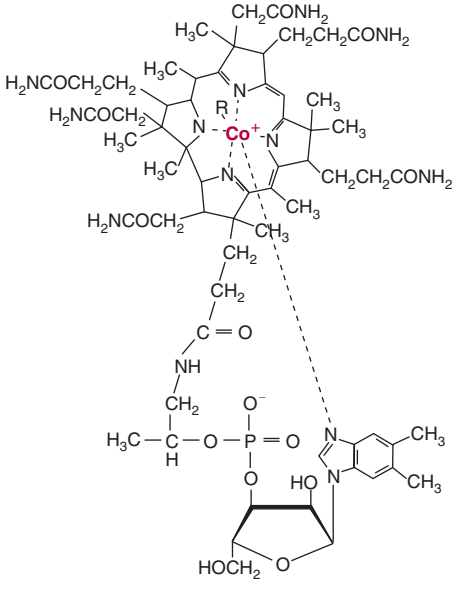


FIGURA 44-13 Vitamina B_{12}. Os quatro sítios de coordenação do átomo de cobalto central são quelados pelos átomos de nitrogênio do anel corrina e um pelo nitrogênio do dimetilbenzimidazol nucleotídeo. O sexto sítio de coordenação pode ser ocupado por: CN^- (cianocobalamina), OH^- (hidroxocobalamina), H_2O (aquocobalamina, $-CH_3$ (metilcobalamina) ou 5′-deoxiadenosina (adenosilcobalamina).

Existem três enzimas dependentes da vitamina B_{12}

A metilmalonil-CoA-mutase, a **leucina-aminomutase** e a **metionina-sintase** (**Figura 44-14**) são enzimas dependentes de vitamina B_{12}. A metilmalonil-CoA é formada como intermediário no catabolismo da valina e por carboxilação do propionil-CoA que surge no catabolismo da isoleucina, do colesterol e, raramente, dos ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono, ou indiretamente do propionato, um produto importante da fermentação microbiana no rúmen. A metilmalonil-CoA sofre um rearranjo dependente da vitamina B_{12} e forma succinil-CoA, em uma reação catalisada pela metilmalonil-CoA-mutase (Figura 20-2). A atividade dessa enzima é acentuadamente reduzida na presença de deficiência de vitamina B_{12}, levando ao acúmulo de metilmalonil-CoA e excreção urinária de ácido metilmalônico, que proporciona um meio de avaliar o estado nutricional da vitamina B_{12}.

A deficiência de vitamina B_{12} provoca anemia perniciosa

Ocorre anemia perniciosa quando a deficiência de vitamina B_{12} afeta o metabolismo do ácido fólico, levando a uma deficiência funcional de folato, que compromete a eritropoiese, produzindo precursores imaturos dos eritrócitos que são liberados na circulação (anemia megaloblástica). A causa mais comum da anemia perniciosa consiste na incapacidade de absorção da vitamina B_{12}, mais do que na sua deficiência dietética. Isso pode resultar da falha de secreção do fator intrínseco causada por doença autoimune, que acomete as células parietais, ou da produção de anti-

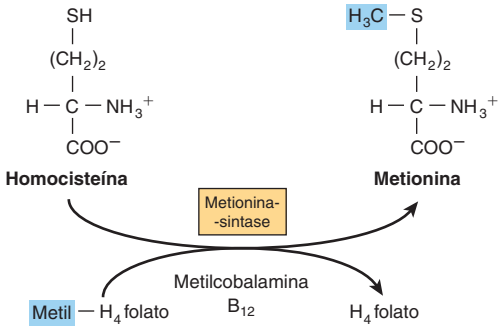


FIGURA 44-14 Homocisteína e o "sequestro do folato". A deficiência de vitamina B_{12} leva ao comprometimento da metionina sintase, resultando em acúmulo de homocisteína e sequestro do folato na forma de metiltetra-hidrofolato.

corpos contra o fator intrínseco. Na anemia perniciosa, ocorre degeneração irreversível da medula espinal, em consequência da falta de metilação de um resíduo de arginina na proteína básica da mielina. Isso resulta da deficiência de metionina no sistema nervoso central, mais do que da deficiência secundária de folato.

EXISTEM MÚLTIPLAS FORMAS DE FOLATO NA DIETA

A forma ativa de ácido fólico (pteroilglutamato) é o tetra-hidrofolato (**Figura 44-15**). Os folatos presentes nos alimentos podem ter até sete resíduos adicionais de glutamato unidos por ligações γ-peptídicas. Além disso, todos os folatos com substituintes de um carbono na Figura 44-15 também podem ser encontrados nos alimentos. O grau com que as diferentes formas de folato podem ser absorvidas varia, e a ingestão de folato é calculada na forma de equivalentes de folato da dieta – a soma dos folatos alimentares em μg + 1,7 × μg de ácido fólico (usado nos alimentos enriquecidos).

O tetra-hidrofolato é um carreador de unidades de um carbono

O tetra-hidrofolato pode transportar fragmentos de um carbono ligados ao *N*-5 (grupos formil, formimino ou metil), ao *N*-10 (formil) ou ao complexo *N*-5-*N*-10 (grupos metileno ou metenil). O 5-formil-tetra-hidrofolato é mais estável do que o folato e, portanto, é utilizado farmaceuticamente (conhecido como **ácido folínico**) e no composto sintético (racêmico)

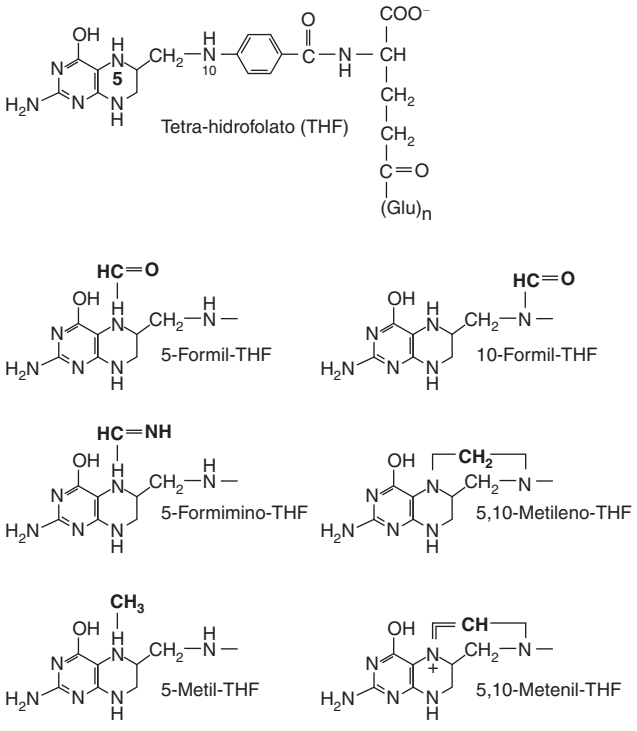


FIGURA 44-15 Ácido tetra-hidrofólico e os folatos com substituição de um carbono.

(**leucovorina**). O principal ponto de entrada dos fragmentos de um carbono dentro dos folatos substituídos é o metileno-tetra-hidrofolato (**Figura 44-16**), que é formado pela reação da glicina, serina e colina com o tetra-hidrofolato. A serina constitui a fonte mais importante de folatos substituídos para as reações de biossíntese, e a atividade da serina hidroximetil-transferase é regulada pelo estado de substituição do folato e pela disponibilidade desse composto. A reação é reversível e, no fígado, pode formar serina a partir da glicina como substrato para a gliconeogênese. O metileno-tetra-hidrofolato, o metenil-tetra-hidrofolato e o 10-formil-tetra-hidrofolato são interconversíveis. Quando não há necessidade de folatos de um carbono, a oxidação do formil-tetra-hidrofolato para produzir dióxido de carbono fornece um mecanismo para a manutenção do reservatório de folato livre.

Os inibidores do metabolismo do folato fornecem fármacos na quimioterapia do câncer, bem como agentes antibacterianos e agentes antimaláricos

A metilação do desoxiuridina monofosfato (dUMP) em timidina monofosfato (TMP), que é catalisada pela timidilato sintase, é essencial para a síntese do DNA. O fragmento de um carbono do metileno tetra-hidrofolato é reduzido a um grupo metil, com liberação do di-hidrofolato, o qual é então reduzido novamente a tetra-hidrofolato pela **di-hidrofolato redutase**. A timidilato sintase e a di-hidrofolato redutase são particularmente ativas nos tecidos que apresentam uma elevada taxa de divisão celular. O **metotrexato**, um análogo do 10-metil-tetra-hidrofolato, inibe a di-hidrofolato redutase e tem sido usado como agente antineoplásico. As di-hidrofolato redutases de algumas bactérias e parasitas diferem da enzima humana; os inibidores dessas enzimas podem ser usados como fármacos antibacterianos (p. ex., **trimetoprima**) e antimaláricos (p. ex., **pirimetamina**).

A deficiência de vitamina B_{12} causa deficiência funcional de folato – o "sequestro do folato"

Quando atua como doador de metil, a *S*-adenosilmetionina forma a homocisteína, que pode ser novamente metilada pelo metiltetra-hidrofolato, em uma reação catalisada pela metionina sintase, uma enzima dependente de vitamina B_{12} (Figura 44-14). Como a redução do metileno-tetra-hidrofolato em metiltetra-hidrofolato é irreversível, e a principal fonte de tetra-hidrofolato para os tecidos é o metiltetra-hidrofolato, o papel da metionina sintase é vital e proporciona uma ligação entre as funções do folato e da vitamina B_{12}. O comprometimento da metionina sintase na deficiência da vitamina B_{12} leva ao acúmulo do metiltetra-hidrofolato – o "sequestro do folato". Portanto, existe uma deficiência funcional de folato, secundária à deficiência de vitamina B_{12}.

A deficiência de folato provoca anemia megaloblástica

A deficiência do próprio ácido fólico ou a deficiência de vitamina B_{12}, a qual leva a uma deficiência funcional de ácido fólico, afeta

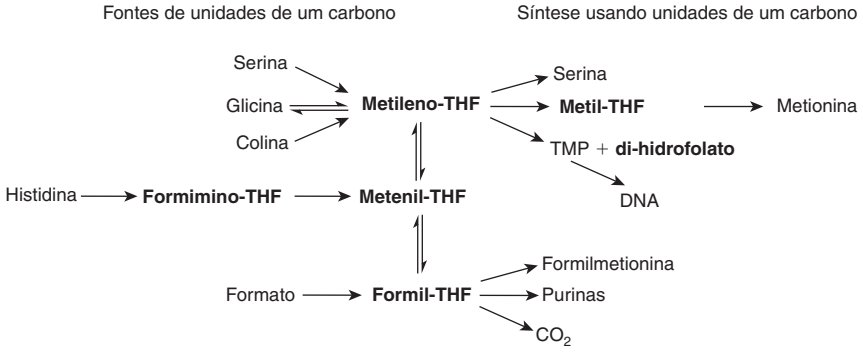


FIGURA 44-16 Fontes e utilização dos folatos com substituição de um carbono.

as células em rápida divisão, visto que elas necessitam de grandes quantidades de timidina para a síntese do DNA. Clinicamente, isso prejudica a medula óssea, levando ao desenvolvimento de anemia megaloblástica.

Os suplementos de ácido fólico reduzem o risco de defeitos do tubo neural e de hiper-homocisteinemia, e também podem reduzir a incidência de doença cardiovascular e de alguns tipos de câncer

O uso de suplementos de 400 μg/dia de folato, quando iniciado antes da concepção, resulta em uma redução significativa na incidência de **espinha bífida** e outros **defeitos do tubo neural**. Devido a esse fato, muitos países exigem que a farinha seja enriquecida com ácido fólico. O nível sanguíneo elevado de homocisteína constitui um fator de risco significativo para a **aterosclerose**, a **trombose** e a **hipertensão**. A condição resulta de um comprometimento na capacidade de sintetizar o metiltetra-hidrofolato pela ação da metileno tetra-hidrofolato redutase, causando deficiência funcional de folato, com consequente incapacidade de metilar novamente a homocisteína em metionina. Os indivíduos com uma variante anormal da metileno-tetra-hidrofolato redutase, que é observada em 5 a 10% da população, não desenvolvem hiper-homocisteinemia se tiverem uma ingestão relativamente alta de folato. Vários estudos clínicos de suplementos de folato (geralmente com vitaminas B_6 e B_{12}) controlados por placebo mostraram a redução esperada nos níveis plasmáticos de homocisteína; todavia, à exceção da redução da incidência de acidente vascular encefálico, não foi observado nenhum efeito sobre a doença cardiovascular.

Há também evidências de que a ingestão baixa de folato compromete a metilação das ilhas de CpG no DNA, um fator envolvido no desenvolvimento do câncer colorretal e de outros tipos de câncer. Vários estudos sugerem que a suplementação de folato ou o consumo de alimentos enriquecidos podem reduzir o risco de desenvolvimento de alguns tipos de câncer. Entretanto, há algumas evidências de que os suplementos de folato aumentam a taxa de transformação dos pólipos colorretais pré-neoplásicos em câncer, de modo que os indivíduos portadores desses pólipos correm risco de desenvolver câncer colorretal se tiverem uma alta ingestão de folato.

O enriquecimento dos alimentos com folato pode representar um risco para algumas pessoas

Os suplementos de folato corrigem a anemia megaloblástica da deficiência de vitamina B_{12}, mas podem acelerar o desenvolvimento da lesão neural (irreversível) observada na deficiência de vitamina B_{12}. Existe também um antagonismo entre o ácido fólico e os anticonvulsivantes usados no tratamento da epilepsia, e, conforme assinalado anteriormente, existem algumas evidências de que os suplementos de folato podem aumentar o risco de desenvolvimento de câncer colorretal entre indivíduos portadores de pólipos colorretais pré-neoplásicos.

A DEFICIÊNCIA DIETÉTICA DE BIOTINA NÃO É CONHECIDA

A **Figura 44-17** ilustra as estruturas da biotina, da biocitina e da carboxibiotina (o intermediário metabólico ativo). A biotina está amplamente distribuída em muitos alimentos na forma de biocitina (ε-aminobiotinil-lisina), que é liberada por proteólise. É sintetizada pela flora intestinal em quantidades acima das necessárias.

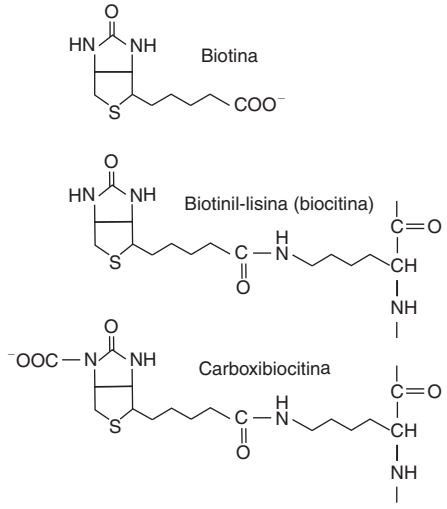


FIGURA 44-17 Biotina, biocitina e carboxibiocitina.

A deficiência não é conhecida, exceto em pacientes mantidos por muitos meses com nutrição parenteral total e em uma porcentagem muito pequena de indivíduos que ingerem quantidades anormalmente grandes de clara de ovo crua, que contém avidina, uma proteína que se liga à biotina, impossibilitando a sua absorção.

A biotina é uma coenzima das enzimas carboxilases

A biotina atua na transferência do dióxido de carbono em um pequeno número de reações: acetil-CoA-carboxilase (Figura 23-1), piruvato-carboxilase (Figura 20-1), propionil-CoA carboxilase (Figura 20-2) e metilcrotonil-CoA carboxilase. A holo-carboxilase sintetase catalisa a transferência da biotina para um resíduo de lisina da apoenzima para formar o resíduo de biocitina da holoenzima. O intermediário reativo é a 1-*N*-carboxibiocitina, formada a partir do bicarbonato, em uma reação dependente de ATP. Em seguida, o grupo carboxi é transferido ao substrato para carboxilação.

A biotina também desempenha um papel na regulação do ciclo celular, atuando na biotinilação das proteínas nucleares essenciais.

O ÁCIDO PANTOTÊNICO, COMO COMPONENTE DA COA E DA ACP, ATUA COMO CARREADOR DE GRUPOS ACIL

O ácido pantotênico desempenha um papel central no metabolismo dos grupos acil, pois atua como fração funcional de panteteína da coenzima A ou da proteína carreadora de acil (ACP) (**Figura 44-18**). A panteteína é formada após a combinação do pantotenato com cisteína, que fornece o grupo prostético –SH da CoA e ACP. A CoA participa nas reações do ciclo do ácido cítrico (Capítulo 17), na oxidação dos ácidos graxos (Capítulo 22), nas acetilações e na síntese do colesterol. A ACP participa na síntese dos ácidos graxos (Capítulo 23). A vitamina está amplamente

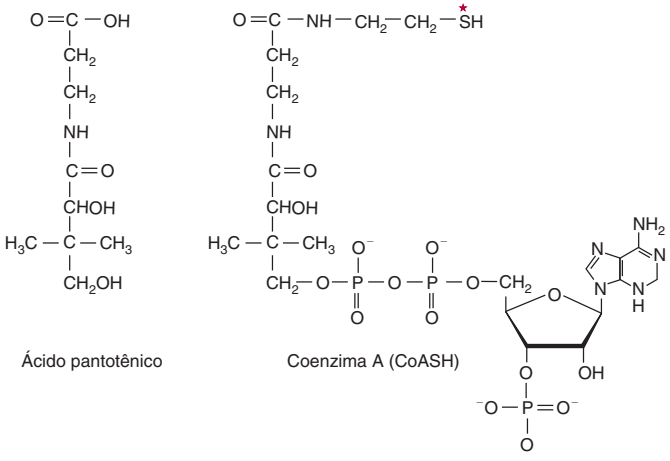


FIGURA 44-18 Ácido pantotênico e coenzima A. O asterisco mostra o sítio de acilação pelos ácidos graxos.

distribuída em todos os tipos de alimentos, e a sua deficiência não foi definitivamente demonstrada nos seres humanos, exceto em estudos de depleção específica.

O ÁCIDO ASCÓRBICO É UMA VITAMINA APENAS PARA ALGUMAS ESPÉCIES

A **vitamina C** (**Figura 44-19**) é uma vitamina para os seres humanos e outros primatas, para porquinhos-da-Índia, morcegos, aves passeriformes e a maioria dos peixes e invertebrados; outros animais a sintetizam como intermediário na via do ácido urônico do metabolismo da glicose (Figura 21-4). Nas espécies em que atua como vitamina, ocorre um bloqueio da via metabólica devido à ausência da gulonolactona oxidase. Tanto o ácido ascórbico quanto o ácido desidroascórbico têm atividade de vitamina.

A vitamina C é a coenzima para dois grupos de hidroxilases

O ácido ascórbico desempenha funções específicas nas hidrolases que contêm cobre e nas hidrolases ligadas ao α-cetoglutarato que contêm ferro. O ácido ascórbico também aumenta a atividade de outras enzimas *in vitro*, embora seja uma ação redutora inespecífica. Além disso, exerce vários efeitos não enzimáticos em decorrência de sua ação como agente redutor e sequestrador de radicais de oxigênio (Capítulo 45).

A **dopamina-β-hidroxilase** é uma enzima que contém cobre e que está envolvida na síntese das catecolaminas (norepinefirna e epinefrina) a partir da tirosina na medula suprarrenal e no sistema nervoso central. Durante a hidroxilação, o Cu^{+} é oxidado a Cu^{2+}; a redução de volta ao Cu^{+} exige especificamente a presença de ascorbato, que é oxidado em monodesidroascorbato.

Diversos hormônios peptídicos apresentam uma amida carboxiterminal que deriva de um resíduo de glicina terminal. Essa glicina é hidroxilada no carbono α por uma enzima que contém cobre, a **peptidilglicina hidroxilase**, que também exige a presença de ascorbato para a redução do Cu^{2+}.

Várias hidroxilases que contêm ferro e dependem da presença de ascorbato compartilham um mecanismo de reação comum, em que a hidroxilação do substrato está ligada à descarboxilação oxidativa do α-cetoglutarato. Muitas dessas enzimas estão envolvidas na modificação de proteínas precursoras. A **prolina** e a **lisina hidroxilase**s são necessárias para a modificação pós-sintética do **pró-colágeno** em **colágeno**, enquanto a prolina hidroxilase também é necessária na formação da **osteocalcina** e do componente C1q do **complemento**. A aspartato β-oxilase é necessária

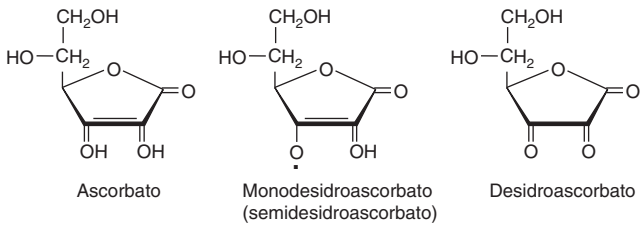


FIGURA 44-19 Vitamina C.

para a modificação pós-sintética do precursor da proteína C, a protease dependente de vitamina K que hidrolisa o fator V ativado na cascata da coagulação sanguínea (Capítulo 50). A trimetil-lisina hidroxilase e a γ-butirobetaína hidroxilase são necessárias para a síntese da carnitina.

A deficiência de vitamina C provoca escorbuto

Os sinais de deficiência de vitamina C consistem em alterações cutâneas, fragilidade dos capilares sanguíneos, deterioração das gengivas, queda dos dentes e fraturas ósseas, muitos dos quais podem ser atribuídos à síntese deficiente de colágeno.

A ingestão de quantidades maiores de vitamina C pode ser benéfica

Com uma ingestão acima de 110 mg/dia, a capacidade do organismo de metabolizar a vitamina C fica saturada, e qualquer quantidade adicional ingerida é excretada na urina. Todavia, além de suas outras funções, a vitamina C aumenta a absorção do ferro inorgânico, e essa propriedade depende de sua presença no intestino. Por esse motivo, a ingestão aumentada dessa vitamina pode ser benéfica. Há poucas evidências de que a vitamina C em altas doses possa evitar o resfriado comum, embora possa reduzir a duração e a gravidade dos sintomas.

OS MINERAIS SÃO NECESSÁRIOS PARA FUNÇÕES TANTO FISIOLÓGICAS QUANTO BIOQUÍMICAS

Muitos dos minerais essenciais (**Tabela 44-6**) estão amplamente distribuídos nos alimentos, e os indivíduos que consomem dietas balanceadas tendem, em sua maioria, a ingerir quantidades adequadas. As quantidades necessárias variam desde alguns gramas por dia no caso do sódio e do cálcio, até miligramas por dia (p. ex., ferro e zinco) e microgramas por dia no caso dos oligoelementos. Em geral, as deficiências de minerais ocorrem quando os alimentos provêm de uma região onde o solo pode estar deficiente em alguns minerais (p. ex., iodo e selênio, cujas deficiências ocorrem em muitas áreas do mundo); quando os alimentos provêm de várias regiões, é menos provável que ocorra deficiência de minerais. Todavia, a deficiência de ferro constitui um problema geral, já que, se as perdas de ferro do organismo forem relativamente grandes (p. ex., em consequência da perda maciça de sangue menstrual), é difícil assegurar uma ingestão adequada para repor as perdas. Os alimentos cultivados em solos que contêm altos níveis de selênio causam efeitos tóxicos, enquanto a ingestão excessiva de sódio provoca hipertensão em indivíduos suscetíveis.

TABELA 44-6 Classificação dos minerais de acordo com a sua função

Função	Mineral
Função estrutural	Cálcio, magnésio, fosfato
Envolvidos na função das membranas	Sódio, potássio
Atuam como grupos prostéticos em enzimas	Cobalto, cobre, ferro, molibdênio, selênio, zinco
Papel regulador ou papel na ação hormonal	Cálcio, cromo, iodo, magnésio, manganês, sódio, potássio
Comprovadamente essenciais, porém com função desconhecida	Silício, vanádio, níquel, estanho
Exercem efeitos no organismo, porém a sua natureza essencial não está estabelecida	Fluoreto, lítio
Podem estar presentes em alimentos, e o seu excesso é reconhecidamente tóxico	Alumínio, arsênico, antimônio, boro, bromo, cádmio, césio, germânio, chumbo, mercúrio, prata, estrôncio

RESUMO

- As vitaminas são nutrientes orgânicos que desempenham funções metabólicas essenciais, geralmente necessárias em pequenas quantidades na dieta, visto que elas não podem ser sintetizadas pelo organismo. As vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) são moléculas hidrofóbicas que exigem uma absorção normal das gorduras para a sua absorção e prevenção de deficiência.
- A vitamina A (retinol), presente nas carnes, e a provitamina (β-caroteno) encontrada nos vegetais, formam o retinaldeído, que é utilizado na visão, e o ácido retinoico, que atua na expressão dos genes.
- A vitamina D é um pró-hormônio esteroide que produz um hormônio ativo, denominado calcitriol, que regula o metabolismo do cálcio e do fosfato; a deficiência de vitamina D leva ao raquitismo e à osteomalacia. A vitamina D desempenha um papel no controle da diferenciação celular e na secreção de insulina.
- A vitamina E (tocoferol) é o antioxidante lipossolúvel mais importante do organismo, que atua na fase lipídica das membranas, protegendo contra os efeitos dos radicais livres.
- A vitamina K age como fator de uma carboxilase, que atua sobre os resíduos de glutamato de proteínas precursoras dos fatores da coagulação, do osso e de outras proteínas, possibilitando a quelação do cálcio.
- As vitaminas hidrossolúveis do complexo B atuam como cofatores enzimáticos. A tiamina é um cofator na descarboxilação oxidativa dos α-cetoácidos e da transcetolase nas vias das pentoses-fosfato. A riboflavina e a niacina são cofatores importantes em reações de oxirredução e estão presentes nas enzimas de flavoproteínas e no NAD e NADP, respectivamente.
- O ácido pantotênico está presente na coenzima A e na proteína carreadora de acil, que atuam como transportadores de grupo acil nas reações metabólicas.
- A vitamina B_6, na forma de piridoxal fosfato, é a coenzima de várias enzimas do metabolismo dos aminoácidos, incluindo as transaminases, e da glicogênio fosforilase. A biotina é a coenzima de várias carboxilases.

- A vitamina B_{12} e o folato fornecem resíduos de um carbono para a síntese do DNA e outras reações; a sua deficiência resulta em anemia megaloblástica.
- A vitamina C é um antioxidante hidrossolúvel que mantém a vitamina E e outros cofatores metálicos no estado reduzido.
- Os elementos minerais inorgânicos que desempenham uma função no organismo precisam ser fornecidos na dieta. Quando a ingestão é insuficiente, pode ocorrer desenvolvimento de deficiência, e a sua ingestão excessiva pode ser tóxica.

REFERÊNCIAS

Bender DA, Bender AE: *Nutrition: A Reference Handbook.* Oxford University Press, 1997.

Bender DA: *Nutritional Biochemistry of the Vitamins,* 2nd ed. Cambridge University Press, 2003.

Department of Health: *Dietary Reference Values for Food Energy and Nutrients for the United Kingdom.* Her Majesty's Stationery Office, 1991.

FAO/WHO: *Human Vitamin and Mineral Requirements: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation: Bankok, Thailand.* Food and Nutrition Division of the United Nations Food and Agriculture Organization, 2000.

Geissler C, Powers HJ: *Human Nutrition,* 12th ed. Elsevier, 2010.

Gibney MJ, Lanham-New S, Cassidy A, et al: *Introduction to Human Nutrition, The Nutrition Society Textbook Series*, 2nd ed. Wiley–Blackwell, 2009.

Institute of Medicine: *Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D and Fluoride*. National Academy Press, 1997.

Institute of Medicine: *Dietary Reference Values for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin and Choline*. National Academy Press, 2000.

Institute of Medicine: *Dietary Reference Values for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids*. National Academy Press, 2000.

Institute of Medicine: *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc.* National Academy Press, 2001.

Scientific Advisory Committee on Nutrition of the Food Standards Agency: *Folate and Disease Prevention.* The Stationery Office, 2006.

CAPÍTULO

45

Radicais Livres e Nutrientes Antioxidantes

David A. Bender, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever os danos causados pelos radicais livres ao DNA, aos lipídeos e às proteínas, bem como as doenças associadas aos danos por radicais livres.
- Descrever as principais fontes de radicais de oxigênio no organismo.
- Descrever os mecanismos e os fatores da dieta que protegem o organismo contra o dano por radicais livres.
- Explicar como os antioxidantes podem atuar como pró-oxidantes, e o motivo pelo qual os estudos clínicos de intervenção com nutrientes antioxidantes geralmente têm produzido resultados decepcionantes.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Os radicais livres são produzidos no organismo em condições normais. Esses radicais livres provocam dano dos ácidos nucleicos, das proteínas, dos lipídeos da membrana celular e das lipoproteínas plasmáticas. A sua ação pode causar câncer, aterosclerose, doença arterial coronária e doenças autoimunes. Os estudos epidemiológicos e laboratoriais realizados identificaram vários nutrientes antioxidantes protetores, como o selênio, as vitaminas C e E, o β-caroteno, outros carotenoides e uma variedade de compostos polifenólicos derivados de alimentos de origem vegetal. Muitas pessoas ingerem suplementos de um ou mais nutrientes antioxidantes. Entretanto, os estudos clínicos de intervenção demonstraram que os suplementos de antioxidantes têm pouco benefício, exceto entre indivíduos que inicialmente estavam deficientes, e muitos estudos clínicos sobre o β-caroteno e a vitamina E mostraram uma taxa aumentada de mortalidade entre indivíduos que fazem uso de suplementos.

As reações dos radicais livres consistem em reações em cadeia autoperpetuantes

Os radicais livres são espécies moleculares altamente reativas com um ou mais elétrons não pareados; persistem apenas por um período de tempo muito curto (da ordem de 10^{-9} a 10^{-12} s) antes de colidir com outra molécula e extrair ou doar um elétron para obter estabilidade. Desse modo, os radicais livres geram um novo radical a partir da molécula com a qual colidiram. A principal maneira pela qual um radical livre pode ser sequestrado, interrompendo, assim, essa reação em cadeia, consiste na reação entre dois radicais, quando os elétrons não pareados podem ser emparelhados em uma das moléculas originais. Entretanto, esse tipo de reação é raro, em virtude da meia-vida muito curta do radical e das concentrações muito baixas de radicais nos tecidos.

Os radicais que provocam maior dano nos sistemas biológicos são os radicais de oxigênio (algumas vezes denominados espécies reativas de oxigênio) – particularmente o superóxido $O_2^{-\cdot}$, a hidroxila $OH^{\cdot}$ e peridroxila $O_2H^{\cdot}$. O dano tecidual causado por radicais de oxigênio é frequentemente denominado dano oxidativo, e os fatores que protegem a lesão por radicais de oxigênio são conhecidos como antioxidantes.

Os radicais podem causar dano no DNA, nos lipídeos e nas proteínas

As interações dos radicais com bases do DNA podem levar a alterações químicas que, se não forem corrigidas por reparo (Capítulo 35), poderão ser herdadas nas células-filhas. O dano de ácidos graxos insaturados nas membranas celulares e nas lipoproteínas plasmáticas por radicais livres leva à formação de peróxidos lipídicos e, em seguida, dialdeídos altamente reativos, que são capazes de modificar quimicamente as proteínas e as bases dos ácidos nucleicos. As proteínas também estão sujeitas a sofrer modificação química direta pela sua reação com radicais. A lesão oxidativa de resíduos de tirosina nas proteínas pode levar à formação de di-hidroxifenilalanina, que pode sofrer reações não enzimáticas, com consequente formação de radicais de oxigênio (**Figura 45-1**).

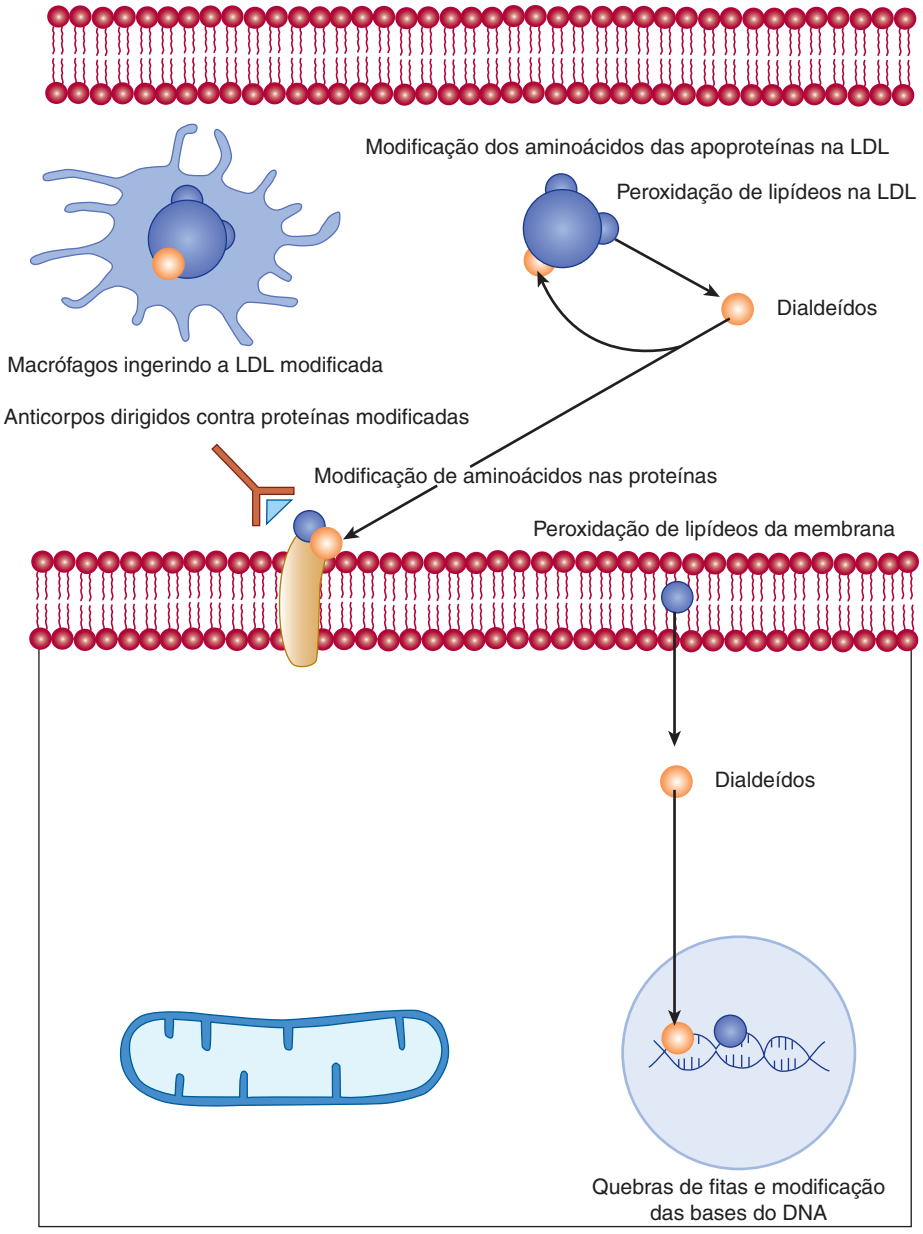


FIGURA 45-1 Dano tecidual por radicais.

A carga corporal total de radicais pode ser estimada pela medição dos produtos da peroxidação lipídica. Os peróxidos de lipídeos podem ser medidos pelo ensaio da oxidação do ferro em xilenol laranja (FOX). Em condições ácidas, eles oxidam o Fe^{2+} a Fe^{3+}, que forma um cromóforo com o xilenol laranja. Os dialdeídos formados a partir dos peróxidos de lipídeos podem ser medidos pela reação com o ácido tiobarbitúrico, quando formam um aduto fluorescente vermelho – os resultados desse ensaio são geralmente expressos como substâncias reativas totais ao ácido tiobarbitúrico, TBARS. A peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados *n*-6 leva à formação de pentano, enquanto a dos ácidos graxos poli-insaturados n-3 leva à produção de etano, ambos os quais podem ser medidos no ar expirado.

O dano por radicais pode causar mutações, câncer, doença autoimune e aterosclerose

O dano do DNA nas células germinativas dos ovários e testículos por radicais pode resultar em mutações herdadas; nas células somáticas, pode levar ao desenvolvimento de câncer. Os dialdeídos formados em decorrência da peroxidação de lipídeos induzida por radicais nas membranas celulares também podem modificar as bases do DNA.

A modificação química de aminoácidos nas proteínas, seja pela ação direta dos radicais ou como resultado da reação com os produtos da peroxidação lipídica induzida por radicais, leva ao reconhecimento das proteínas como não próprias pelo sistema imune. Os anticorpos consequentemente produzidos também

irão apresentar uma reação cruzada com as proteínas teciduais normais, desencadeando, assim, uma doença autoimune.

A modificação química das proteínas ou dos lipídeos nas lipoproteínas de baixa intensidade (LDL) do plasma leva à formação de LDL anormais, que não são reconhecidas pelos receptores hepáticos de LDL, não sendo, portanto, depuradas pelo fígado. As LDL modificadas são captadas por receptores *scavenger* dos macrófagos. Os macrófagos saturados de lipídeos infiltram o endotélio dos vasos sanguíneos (particularmente quando já existe algum dano no endotélio) e são destruídos pelo alto conteúdo de colesterol não esterificado que eles acumularam. Esse processo é observado no desenvolvimento das placas ateroscleróticas que, nos casos extremos, pode causar oclusão mais ou menos completa de um vaso sanguíneo.

Existem múltiplas fontes de radicais de oxigênio no corpo

A radiação ionizante (raios X e UV) pode causar lise da água, levando à formação de radicais hidroxila. Os íons metálicos de transição, incluindo Cu^{+}, Co^{2+}, Ni^{2+} e Fe^{2+}, podem reagir de modo não enzimático com o oxigênio ou com o peróxido de hidrogênio, levando mais uma vez à formação de radicais hidroxila. O óxido nítrico (o fator de relaxamento derivado do endotélio) sendo um radical também pode reagir com superóxido, produzindo o peroxinitrito, que se decompõe para formar radicais hidroxila (**Figura 45-2**).

A explosão respiratória dos macrófagos ativados (Capítulo 52) consiste na utilização aumentada de glicose pela via das pentoses-fosfato (Capítulo 21) para reduzir o $NADP^{+}$ a NADPH, e na utilização aumentada de oxigênio para oxidar o NADPH, produzindo radicais de oxigênio (e halogênio) como agentes citotóxicos para matar os microrganismos fagocitados. A oxidase da explosão respiratória (NADPH oxidase) é uma flavoproteína que reduz o oxigênio em superóxido: $NADPH + 2O_2 \rightarrow NADPH^{+} + 2O_2^{\cdot-} + 2H^{+}$. Os marcadores plasmáticos de lesão dos lipídeos por radicais aumentam de modo considerável mesmo em resposta a uma infecção leve.

A oxidação das coenzimas de flavina reduzida nas cadeias de transporte de elétrons mitocondrial (Capítulo 13) e microssomal

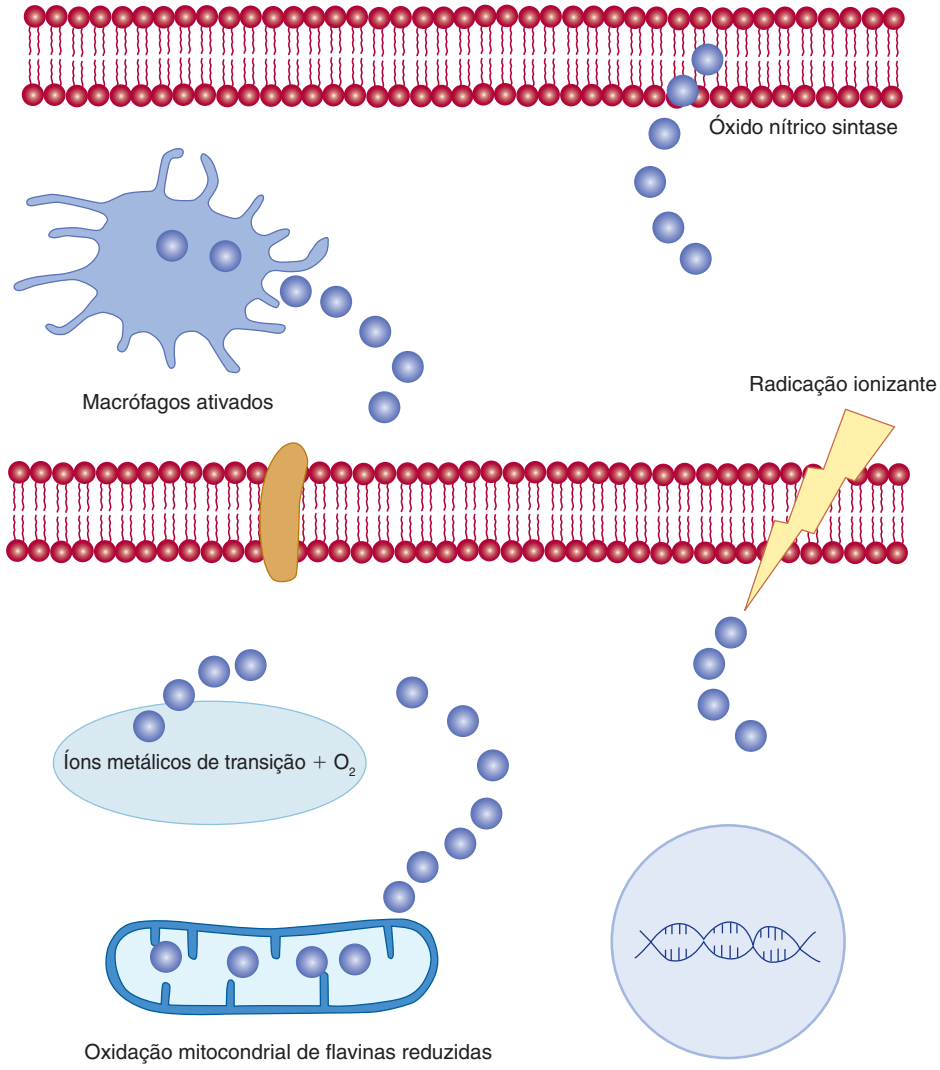


FIGURA 45-2 Fontes dos radicais.

prossegue por meio de uma série de etapas nas quais o radical de semiquinona de flavina é estabilizado pela proteína à qual está ligado, formando radicais de oxigênio como intermediários transitórios. Embora os produtos finais não sejam radicais, ocorre um considerável "vazamento" de radicais em virtude da natureza imprevisível dos radicais, e cerca de 3 a 5% do consumo diário de 30 mol de oxigênio por um ser humano adulto são convertidos em oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio, superóxido e radicais de peridroxila, em lugar de sofrer redução completa em água. Isso resulta na produção diária de cerca de 1,5 mol de espécies reativas de oxigênio.

Existem vários mecanismos de proteção contra o dano causado por radicais

Os íons metálicos que sofrem reação não enzimática para formar radicais de oxigênio não estão normalmente livres em solução, porém ligados às proteínas para as quais fornecem o grupo prostético, ou a proteínas específicas de transporte e de armazenamento, de modo que não são reativos. O ferro está ligado à transferrina, ferritina e hemossiderina, o cobre à ceruloplasmina, enquanto outros íons metálicos estão ligados à metalotioneína. Essa ligação às proteínas de transporte que são muito grandes para serem filtradas nos rins também impede a perda dos íons metálicos na urina.

O superóxido é produzido acidentalmente e também como uma espécie reativa de oxigênio necessária para diversas reações catalisadas por enzimas. Uma família de superóxido dismutases catalisa a reação entre o superóxido e os prótons, produzindo oxigênio e peróxido de hidrogênio: $O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$. Em seguida, o peróxido de hidrogênio é removido pela catalase e por várias peroxidases: $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$. As enzimas que produzem e que necessitam de superóxido estão, em sua maioria, localizadas nos peroxissomos, juntamente com a superóxido dismutase, a catalase e as peroxidases.

Os peróxidos que são formados devido a danos dos lipídeos das membranas e das lipoproteínas plasmáticas por radicais são reduzidos a hidroxiácidos graxos pela glutationa peroxidase, uma enzima dependente de selênio (o que explica a importância de um aporte adequado de selênio para maximizar a atividade antioxidante), e a glutationa oxidada é reduzida pela glutationa redutase dependente de NADPH (Figura 21-3). Os peróxidos de lipídeos também são reduzidos a hidroxiácidos graxos pela vitamina E, formando o radical tocoferoxila relativamente estável, que persiste por um tempo suficiente para sofrer redução de volta ao tocoferol pela reação com vitamina C na superfície da célula ou da lipoproteína (Figura 44-6). O radical monodesidroascorbato resultante sofre então uma redução enzimática de volta a ascorbato ou a uma reação não enzimática de 2 moles de monodesidroascorbato para produzir 1 mol de ascorbato e 1 mol de desidroascorbato.

O ascorbato, o ácido úrico e uma variedade de polifenóis derivados de alimentos vegetais atuam como antioxidantes hidrossolúveis de sequestro de radicais, os quais formam radicais relativamente estáveis que persistem por um período de tempo suficiente para sofrer reação em produtos não radicais. A ubiquinona e os carotenos atuam de modo semelhante como antioxidantes lipossolúveis de sequestro de radicais nas membranas e nas lipoproteínas plasmáticas.

Os antioxidantes também podem ser pró-oxidantes

Embora o ascorbato seja um antioxidante, reagindo com superóxido e hidroxila para produzir monodesidroascorbato, peróxido de hidrogênio ou água, ele também pode constituir uma fonte de radicais de superóxido pela sua reação com oxigênio assim como de radicais de hidroxila pela sua reação com íons (**Tabela 45-1**). Todavia, essas ações pró-oxidantes necessitam de concentrações relativamente altas de ascorbato que não tendem a ser alcançadas nos tecidos, já que, quando a concentração plasmática de ascorbato atinge cerca de 30 mmol/L, o limiar renal é alcançado, e, com uma ingestão acima de cerca de 100 a 120 mg/dia, a vitamina é excretada quantitativamente na urina de acordo com a sua ingestão.

Evidências epidemiológicas consideráveis sugerem que o caroteno possui a função de proteção contra o câncer de pulmão e outros tipos de câncer. Entretanto, dois estudos clínicos de intervenção de grande porte, realizados na década de 1990, demonstraram um aumento da taxa de mortalidade por câncer de pulmão (e outros tipos de câncer) entre pessoas que tomavam suplementos de β-caroteno. O problema é que, apesar de o β-caroteno ser, com efeito, um antioxidante que sequestra radicais em condições de baixa pressão parcial de oxigênio, conforme observado na maioria dos tecidos, na presença de uma alta pressão parcial de oxigênio (como aquela encontrada nos pulmões) e, particularmente, em altas concentrações, o β-caroteno é um pró-oxidante autocatalítico, podendo, assim, causar lesão dos lipídeos e das proteínas por radicais.

As evidências epidemiológicas também sugerem que a vitamina E protege contra a aterosclerose e a doença cardiovascular. Entretanto, uma metanálise de estudos clínicos de intervenção com vitamina E mostrou uma taxa aumentada de mortalidade entre pessoas que ingerem suplementos (em altas doses). Todos esses estudos clínicos usaram o α-tocoferol, e é possível que os outros vitâmeros da vitamina E que estão presentes nos alimentos, mas não nos suplementos, sejam importantes. As lipoproteínas plasmáticas *in vitro* formam menos hidroperóxidos de ésteres de colesterol quando incubadas com fontes de radicais peridroxila em baixas concentrações quando a vitamina E é removida do que quando está presente. O problema parece residir na ação da vitamina E como antioxidante, formando um radical estável que

TABELA 45-1 Funções antioxidantes e pró-oxidantes da vitamina C

Funções antioxidantes:
Ascorbato + $O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2$ + monodesidroascorbato; catalase e peroxidases catalisam a reação: $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
Ascorbato + $OH^{\cdot} \rightarrow H_2O$ + monodesidroascorbato
Funções pró-oxidantes:
Ascorbato + $O_2 \rightarrow O_2^{\cdot-}$ + monodesidroascorbato
Ascorbato + $Cu^{2+} \rightarrow Cu^+$ + monodesidroascorbato
$Cu^+ + H_2O_2 \rightarrow Cu^{2+} + OH + OH^{\cdot}$

persiste por um período de tempo suficiente para ser metabolizado em produtos não radicais. Isso significa que o radical também persiste por um período de tempo suficiente para penetrar mais profundamente nas lipoproteínas, causando mais lesão por radicais, em lugar de interagir com um antioxidante hidrossolúvel na superfície da proteína.

RESUMO

- Os radicais livres são espécies moleculares altamente reativas com um ou mais elétrons não pareados; eles podem reagir com proteínas, ácidos nucleicos e ácidos graxos das membranas celulares e lipoproteínas plasmáticas, modificando-os.
- O dano causado por radicais nos lipídeos e nas proteínas das lipoproteínas plasmáticas constitui um fator no desenvolvimento da aterosclerose e na doença arterial coronária; o dano dos ácidos nucleicos por radicais pode induzir mutações herdadas e câncer; o dano das proteínas por radicais pode levar ao desenvolvimento de doenças autoimunes.
- Os radicais de oxigênio surgem em decorrência da exposição à radiação ionizante, de reações não enzimáticas de íons metálicos de transição, da explosão respiratória dos macrófagos ativados e da oxidação normal de coenzimas de flavina reduzida.
- A proteção contra o dano por radicais é proporcionada por enzimas que removem íons superóxido e peróxido de hidrogênio, pela redução enzimática de peróxidos de lipídeos ligados à oxidação da glutationa, pela reação não enzimática de peróxidos de lipídeos com vitamina E, e pela reação de radicais com determinados compostos, como as vitaminas C e E, o caroteno, a ubiquinona, o ácido úrico e os polifenóis da dieta, que formam radicais relativamente estáveis que persistem por um período de tempo longo o suficiente para sofrer reação, formando produtos não radicais.
- Com exceção dos indivíduos que inicialmente são deficientes, os estudos clínicos de intervenção com vitamina E e β-caroteno, mostraram, de modo geral, um aumento da taxa de mortalidade entre os que tomam suplementos. O β-caroteno é um antioxidante apenas em baixas concentrações de oxigênio; em concentrações mais altas de oxigênio, ele atua como pró-oxidante autocatalítico. A vitamina E forma um radical estável, que é capaz de sofrer reação com antioxidantes hidrossolúveis ou penetrar mais profundamente nas lipoproteínas e nos tecidos, aumentando, assim, o dano por radicais.

REFERÊNCIAS

Asplund K: Antioxidant vitamins in the prevention of cardiovascular disease: a systematic review. J Intern Med 2002;251:372.

Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, et al: Mortality in randomised trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention. JAMA 2007;297:842.

Burton G, Ingold K: β-Carotene, an unusual type of lipid antioxidant. Science 1984;224:569.

Carr A, Frei B: Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? FASEB J 1999;13:1007.

Cordero Z, Drogan D, Weikert C, et al: Vitamin E and risk of cardiovascular diseases: a review of epidemiologic and clinical trial studies. Crit Rev Food Sci Nutr 2010;50;420.

Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I: No evidence supports vitamin E indiscriminate supplementation. Biofactors 2009;35:469.

Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE: Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? J Lab Clin Med 1992;119:598.

Imlay JA: Pathways of oxidative damage. Ann Rev Microbiol 2003;57:395.

Imlay JA: Cellular Defenses against superoxide and hydrogen peroxide. Ann Rev Biochem 2008;77:755.

Klaunig JE, Kamendulis LM: The role of oxidative stress in carcinogenesis. Ann Rev Pharm Tox 2004;44:239.

Miller ER, Pastor-Barriuso R, Dalal D, et al: Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. Ann Intern Med 2005;142:37.

Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, et al: Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. N Engl J Med 1996;334:1150.

Various authors: Symposium: Antioxidant vitamins and β-carotene in disease prevention. Amer J Clin Nutr 1995;62(suppl 6): 12995–15405.

Various authors: Symposium Proceedings: Molecular mechanisms of protective effects of vitamin E in atherosclerosis. J Nutr 2001;131:366–397.

CAPÍTULO

46

Tráfego Intracelular e Seleção das Proteínas

Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Inferir que muitas proteínas são direcionadas por sequências sinais a seus destinos corretos, e que o aparelho de Golgi desempenha um importante papel na seleção de proteínas.
- Compreender que sinais especializados estão envolvidos na seleção de proteínas para as mitocôndrias, o núcleo e os peroxissomos.
- Reconhecer que peptídeos sinais N-terminais desempenham um papel essencial no direcionamento das proteínas recém-sintetizadas para o lúmen do retículo endoplasmático.
- Saber que as chaperonas impedem o dobramento defeituoso de outras proteínas, que existem mecanismos para a eliminação das proteínas dobradas de maneira imprópria, e que o retículo endoplasmático atua como compartimento de controle de qualidade.
- Compreender que a ubiquitina é uma proteína-chave na degradação das proteínas.
- Identificar o importante papel das vesículas transportadoras no transporte intracelular.
- Constatar que muitas doenças resultam de mutações em genes que codificam proteínas envolvidas no transporte intracelular e familiarizar-se com os termos doenças conformacionais e doenças de deficiência proteostáticas.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

As proteínas precisam ser transportadas dos polirribossomos, onde são sintetizadas, para muitos locais diferentes na célula, a fim de desempenhar suas funções específicas. Algumas estão destinadas a serem componentes de organelas específicas, umas têm como destino o citosol ou a exportação, e outras ainda irão se localizar nas várias membranas celulares. Por conseguinte, existe um considerável **tráfego intracelular de proteínas**. Um importante avanço foi a demonstração, feita por Blobel e, subsequentemente, por outros, de que as proteínas, para alcançar seus locais apropriados, geralmente contêm uma **informação** (um sinal ou uma sequência de codificação) que as **direciona** corretamente. Quando alguns desses sinais foram definidos (ver **Tabela 46-1**), ficou evidente que **determinadas doenças** resultam de mutações que alteram esses sinais. Neste capítulo, serão analisados o tráfego intracelular das proteínas e a sua seleção e, por fim, serão descritos, de modo sucinto, alguns dos distúrbios que ocorrem em consequência de anormalidades nesses processos.

MUITAS PROTEÍNAS SÃO DIRECIONADAS POR SEQUÊNCIAS SINAIS PARA SEUS DESTINOS CORRETOS

As vias de biossíntese de proteínas nas células podem ser consideradas como **um grande sistema de seleção**. Muitas proteínas transportam **sinais** (frequentemente, mas nem sempre, sequências específicas de aminoácidos) que as direcionam para seu destino, assegurando, desse modo, que irão alcançar a membrana ou o compartimento celular apropriado; esses sinais constituem um componente fundamental do sistema de seleção. Em geral, as sequências de sinalização são reconhecidas e interagem com áreas complementares de outras proteínas, que atuam como receptores das proteínas que contêm esses sinais.

Ocorre uma **importante decisão seletiva** no início do processo de biossíntese proteica, quando proteínas específicas são sintetizadas nos **polirribossomos livres** ou **ligados à membrana**.

TABELA 46-1 Algumas sequências ou moléculas que direcionam as proteínas para organelas específicas

Sequência ou composto de direcionamento	Organela-alvo
Peptídeo sinal N-terminal	RE
Sequência KDEL carboxiterminal (Lys-Asp-Glu-Leu) em proteínas residentes do RE em vesículas COPI	Lúmen do RE
Sequências diácidas (p. ex., Asp-X-Glu) em proteínas de membrana em vesículas COPII	Membranas de Golgi
Sequência aminoterminal (20 a 50 resíduos)	Matriz mitocondrial
NLS (p. ex., Pro_2-Lys_3-Arg-Lys-Val)	Núcleo
PTS (p. ex., Ser-Lys-Leu)	Peroxissomo
Manose-6-fosfato	Lisossomo

Abreviaturas: NLS, sinal se localização nuclear; PTS, sequência de direcionamento da matriz peroxissômica.

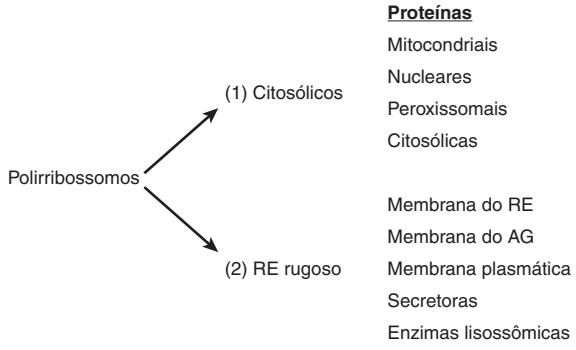


FIGURA 46-1 Representação esquemática dos dois ramos de seleção das proteínas que ocorrem por meio de sua síntese nos (1) polirribossomos citosólicos e (2) polirribossomos ligados à membrana. As proteínas mitocondriais citadas são codificadas por genes nucleares; um dos sinais utilizados na seleção subsequente das proteínas da matriz mitocondrial está relacionado na Tabela 46-1. (RE, retículo endoplasmático; AG, aparelho de Golgi.)

É importante compreender que esses dois tipos de ribossomos são idênticos na sua estrutura e potencialmente intercambiáveis. Entretanto, se uma cadeia polipeptídica em crescimento fixada aos polirribossomos carece de um peptídeo sinal N-terminal (ver adiante), ela não irá interagir com a membrana do retículo endoplasmático (RE), e esses polirribossomos são então descritos como citosólicos. Por outro lado, uma cadeia polipeptídica em crescimento que contém um peptídeo sinal N-terminal irá reagir com a membrana do RE, e os polirribossomos aos quais está fixada são descritos como polirribossomos ligados à membrana. Essa distinção resulta em dois grupos seletivos, denominados **ramo citosólico** e **ramo do RE rugoso** (**RER**) (**Figura 46-1**).

As proteínas sintetizadas pelos polirribossomos citosólicos são dirigidas às mitocôndrias, aos núcleos e aos peroxissomos por sinais específicos, ou permanecem no citosol caso careçam de sinal. Toda proteína que contém uma sequência de direcionamento, que é posteriormente removida, é designada como **pré-proteína**. Em alguns casos, um segundo peptídeo também é removido, e, assim, a proteína original é conhecida como **pré-pró-proteína** (p. ex., pré-pró-albumina; Capítulo 50).

As proteínas sintetizadas e selecionadas no **ramo do RE rugoso** (Figura 46-1) incluem muitas proteínas destinadas às várias membranas (p. ex., do RE, do aparelho de Golgi [AG], da membrana plasmática [MP]) e à secreção. As enzimas lisossomais também estão incluídas nesse grupo. Portanto, essas diversas proteínas podem residir na membrana ou no lúmen do RE, ou podem seguir a principal via de transporte das proteínas intracelulares para o AG. Toda a via de RE → AG → membrana plasmática é frequentemente denominada **via secretora** ou **exocitótica**. A via secretora foi delineada pela primeira vez com o trabalho de George Palade e colaboradores, que usaram aminoácidos radioativos e radioautografia para seguir o destino das proteínas sintetizadas no pâncreas exócrino. Os eventos que ocorrem ao longo da via secretora serão descritos com atenção especial neste capítulo. As proteínas destinadas ao AG, à MP e a alguns outros locais ou à secreção são transportadas em **vesículas de transporte** (**Figura 46-2**); a formação dessas partículas importantes será descrita de modo sucinto mais adiante. Outras proteínas destinadas à secreção são transportadas em vesículas secretoras (Figura 46-2). Essas vesículas são proeminentes no pâncreas e em algumas outras glândulas. Sua mobilização e secreção são reguladas, e, com frequência, essas vesículas são descritas como de "**secreção regulada**". Em contrapartida, o transporte de vesículas que ocorre continuamente pela via secretora é designado como "**transporte constitutivo**". A passagem de enzimas dos lisossomos que utilizam o sinal de manose-6-fosfato é descrita no Capítulo 47.

O aparelho de Golgi está envolvido na glicosilação e na seleção de proteínas

O **AG** desempenha dois papéis importantes na síntese proteica. Em primeiro lugar, está envolvido no **processamento das cadeias oligossacarídicas** da membrana e de outras glicoproteínas de ligação N e também contém enzimas envolvidas na O-glicosilação (ver Capítulo 47). Em segundo lugar, o AG está envolvido na **seleção** de várias proteínas antes de seu transporte a seus destinos intracelulares apropriados. Todas as partes do AG participam da primeira função, enquanto a **rede *trans*-Golgi** (TGN) está particularmente envolvida na segunda função e é muito rica em vesículas.

Uma ampla variedade de técnicas experimentais foi utilizada para investigar o tráfego e o processo de seleção

As abordagens que possibilitaram importantes descobertas sobre os processos descritos neste capítulo incluem: (1) a microscopia eletrônica; (2) o uso de mutantes de leveduras; (3) o fracionamento subcelular; (4) a aplicação de técnicas de DNA recombinante (p. ex., mutação ou eliminação de determinadas sequências das proteínas, ou fusão de novas sequências com essas proteínas); (5) desenvolvimento de sistemas *in vitro* (p. ex., para estudar a translocação no RE e os mecanismos de formação de vesículas); (6) o uso de marcadores fluorescentes para acompanhar o movimento das proteínas; e (7) estudos estruturais de determinadas proteínas, particularmente por cristalografia por raios X.

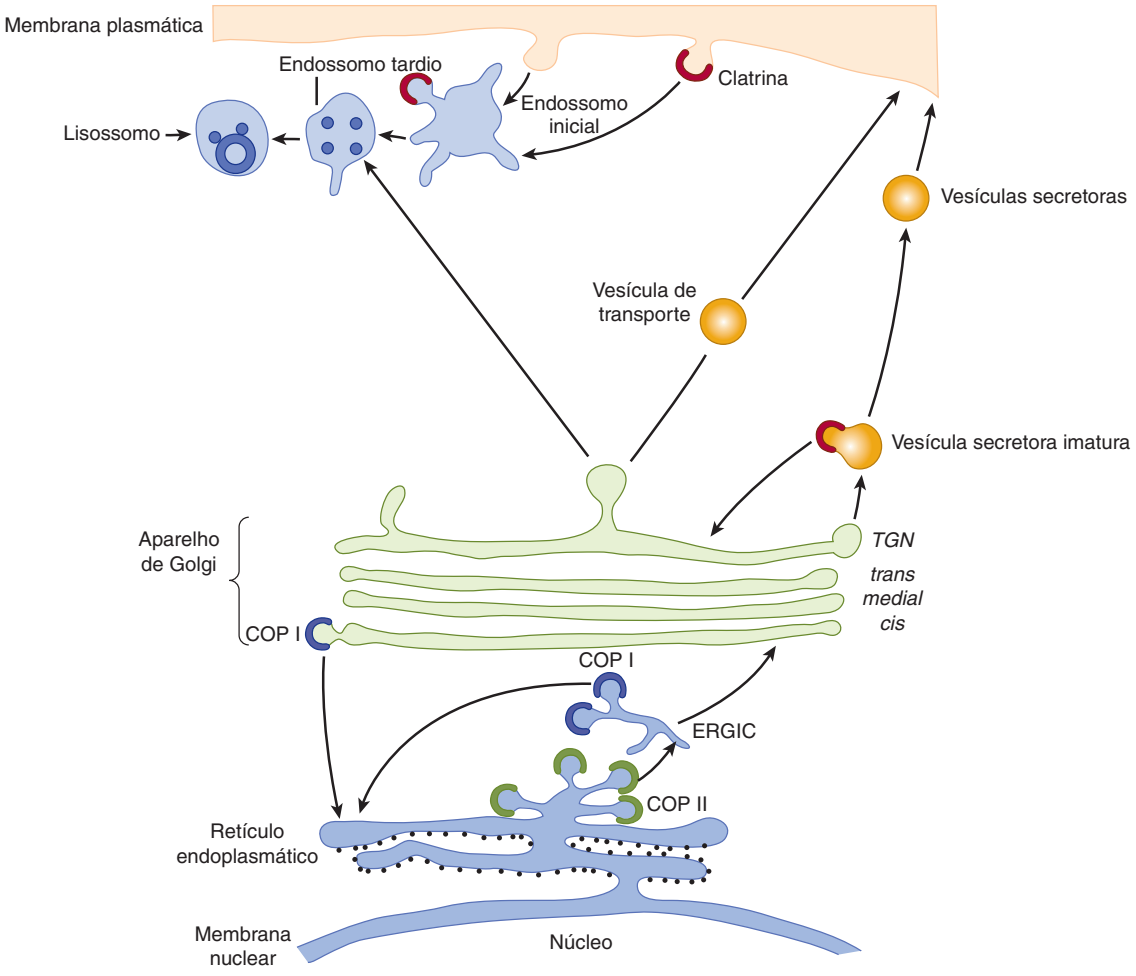


FIGURA 46-2 Ilustração esquemática do ramo do RE rugoso para a seleção das proteínas. As proteínas recém-sintetizadas são inseridas na membrana ou no lúmen do RE a partir dos polirribossomos ligados à membrana (pequenos círculos pretos recobrindo a superfície citosólica do RE). As proteínas transportadas para fora do RE são carreadas em vesículas COPII até a rede *cis*-Golgi (transporte anterógrado). O movimento das proteínas pelo aparelho de Golgi parece ocorrer principalmente por maturação das cisternas. Na TGN, isto é, o lado de saída do aparelho de Golgi, as proteínas são segregadas e selecionadas. As proteínas secretoras acumulam-se em vesículas secretoras (secreção regulada), a partir das quais são expelidas na membrana plasmática. As proteínas destinadas à membrana plasmática ou aquelas que são secretadas de modo constitutivo são transportadas para fora da superfície celular em vesículas de transporte (secreção constitutiva). As vesículas revestidas de clatrina estão envolvidas na endocitose, transportando o seu carregamento até os endossomos tardios e os lisossomos. A manose-6-fosfato (não ilustrada; ver Capítulo 47) atua como sinal para transportar enzimas até os lisossomos. As vesículas COPI estão envolvidas na recuperação de proteínas do aparelho de Golgi para o RE (transporte retrógrado) e podem atuar em algum transporte intragolgi. As vesículas COPII estão envolvidas na concentração do carregamento para exportação do RE para o AG. O carregamento normalmente passa pelo compartimento ERGIC até o AG. (TGN, rede *trans*-Golgi; ERGIC, complexo intermediário de RE-Golgi.) (Cortesia de E. Degen.)

A seleção das proteínas que pertencem ao **ramo citosólico** mencionado anteriormente é descrita a seguir, começando com as proteínas mitocondriais.

A MITOCÔNDRIA IMPORTA E SINTETIZA PROTEÍNAS

As **mitocôndrias** contêm muitas proteínas. O **genoma mitocondrial** (**mt**) codifica treze polipeptídeos (principalmente componentes da cadeia de transporte de elétrons da membrana), que são sintetizados na mitocôndria, utilizando o seu próprio sistema de síntese proteica. Entretanto, a maioria (pelo menos várias centenas) é codificada por **genes nucleares**; essas proteínas são sintetizadas fora das mitocôndrias, nos **polirribossomos** citosólicos, e precisam ser importadas. As **leveduras** demonstraram ser um sistema particularmente útil para analisar os mecanismos de importação das proteínas mitocondriais, em parte devido à possibilidade de gerar uma variedade de **mutantes**, que permitiram esclarecer os processos fundamentais envolvidos. Os maiores progressos foram efetuados no estudo das proteínas presentes na **matriz mitocondrial**, como as subunidades F_1 da ATPase. Apenas a via de importação das proteínas da matriz será discutida de modo pormenorizado a seguir.

As **proteínas da matriz** dos polirribossomos citosólicos precisam atravessar as **membranas mitocondriais externa** e **interna**

para atingir o seu destino. A passagem através das duas membranas é denominada **translocação**. Essas proteínas apresentam uma sequência líder aminoterminal (**pré-sequência**), com cerca de 20 a 50 aminoácidos de comprimento (ver Tabela 46-1), a qual não é altamente conservada, mas é anfipática e contém muitos aminoácidos hidrofóbicos e de carga positiva (p. ex., Lys ou Arg). A pré-sequência equivale ao peptídeo sinal que medeia a fixação dos polirribossomos às membranas do RE (ver adiante), porém, neste caso, para **direcionar as proteínas para a matriz.** A **Figura 46-3** mostra algumas características gerais da passagem de uma proteína do citosol para a matriz mt.

A translocação é um processo **pós-tradução** que ocorre após a liberação das proteínas da matriz dos polirribossomos citosólicos. As interações com algumas das proteínas citosólicas que atuam como **chaperonas** (ver adiante) e **fatores de direcionamento** ocorrem antes da translocação.

Dois **complexos de translocação** distintos estão localizados nas membranas mitocondriais externa e interna, designados (respectivamente) como TOM (translocase da membrana externa) e TIM (translocase da membrana interna). Cada complexo foi analisado, e foi constatado que eles são constituídos de diversas proteínas, das quais algumas atuam como **receptores** (p. ex., **Tom20/22**) das proteínas que chegam, enquanto outras atuam como **componentes** (p. ex., **Tom40**) **dos poros transmembrana** através dos quais essas proteínas precisam passar. As proteínas devem estar no **estado desdobrado** para passar pelos complexos, e isso se torna possível pela **ligação dependente de ATP a várias proteínas chaperonas**. Os papéis desempenhados pelas proteínas chaperonas no dobramento das proteínas são discutidos posteriormente, neste capítulo. Nas mitocôndrias, essas proteínas estão envolvidas na translocação, na seleção, no dobramento, na montagem e na decomposição das proteínas importadas. É

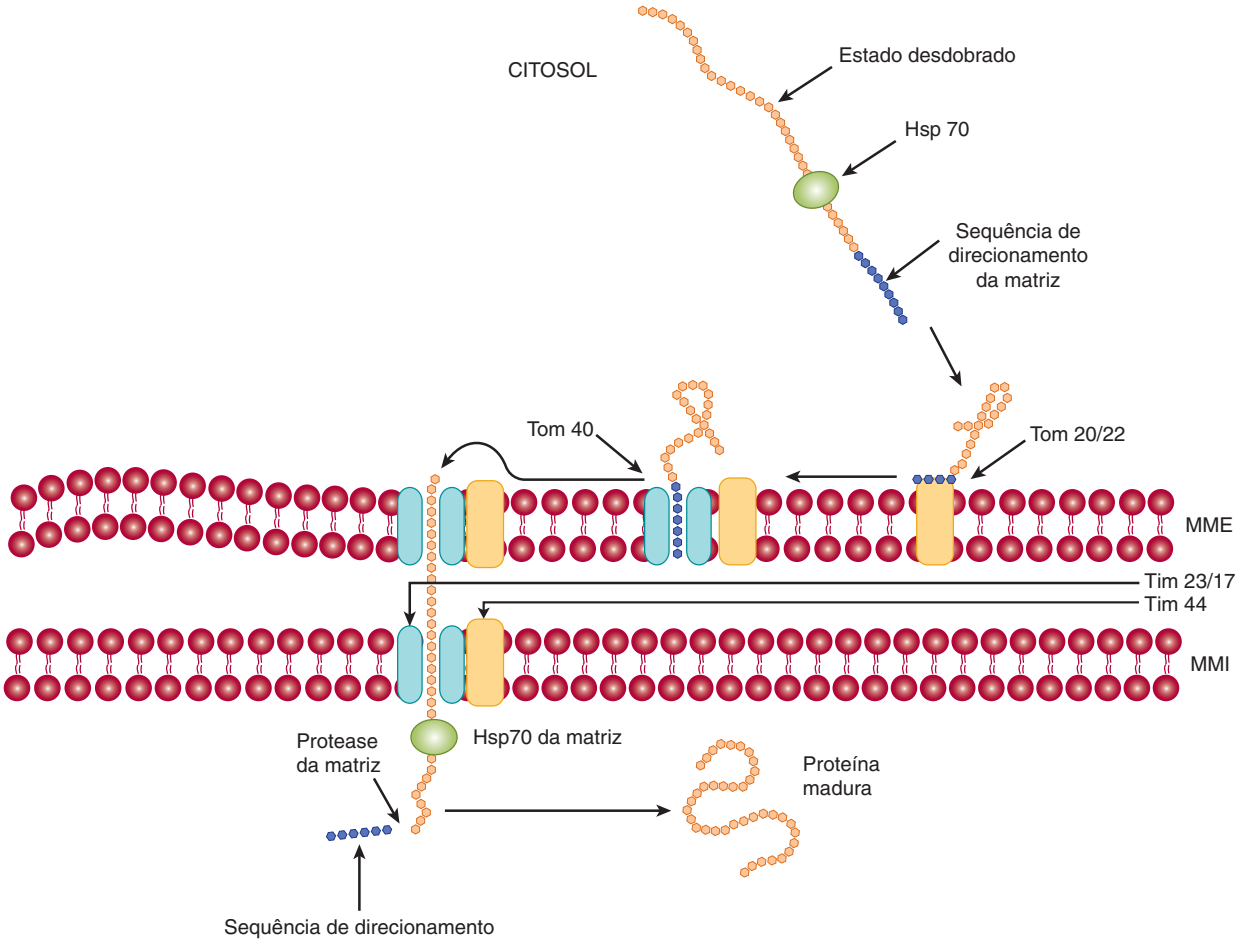


FIGURA 46-3 Ilustração esquemática da entrada de uma proteína na matriz mitocondrial. A proteína desdobrada sintetizada nos polirribossomos citosólicos, a qual contém uma sequência de direcionamento para a matriz, interage com a chaperona citosólica Hsp70. Em seguida, a proteína interage com o receptor da membrana externa mt, Tom 20/22, que é transferida para o canal de importação adjacente Tom 40 (Tom, translocon da membrana externa). A proteína é então translocada através do canal, que é composto, em grande parte, pelas proteínas Tim 23 e Tim 17 (Tim, translocon da membrana interna). No interior da membrana mt interna, interage com a chaperona da matriz Hsp70, que, por sua vez, interage com a proteína de membrana Tim 44. A hidrólise do ATP pela Hsp70 mt provavelmente ajuda a impulsionar a translocação, assim como o interior eletronegativo da matriz. A sequência de direcionamento é posteriormente clivada pela enzima de processamento da matriz, e a proteína importada assume o seu formato final ou pode interagir com uma chaperonina mt antes disso. No local de translocação, as membranas mt externa e interna estão em estreito contato. MME, membrana mitocondrial externa; MMI, membrana mitocondrial interna. (Modificada, com autorização, de Lodish H, et al.: *Molecular Cell Biology*, 6th ed. W.H. Freeman & Co., 2008.)

necessária uma **força proton-motora** agindo sobre a membrana interna para importação, a qual é composta de um **potencial elétrico** através da membrana (interior negativo) e do **gradiente de pH** (ver Capítulo 13). A passagem da sequência líder de carga positiva através da membrana pode ser auxiliada pela carga negativa da matriz. A pré-sequência é clivada, na matriz, por uma **protease de processamento da matriz** (**MPP**). O contato com **outras chaperonas** presentes na matriz é essencial para completar todo o processo de importação. A interação com a mt-Hsp70 (mt = mitocondrial; Hsp = proteína do choque térmico; 70 = ~70 kDa) assegura a importação correta para dentro da matriz e impede o dobramento incorreto ou a agregação, enquanto a interação com o sistema mt-Hsp60-Hsp10 assegura um dobramento apropriado. As interações das proteínas importadas com as chaperonas mencionadas anteriormente exigem a **hidrólise do ATP** para impulsionar a sua ocorrência.

Os detalhes de como as pré-proteínas são translocadas ainda não foram elucidados por completo. É possível que o potencial elétrico associado à membrana mitocondrial interna produza uma mudança de conformação da pré-proteína desdobrada que está sendo translocada, auxiliando a sua passagem. Além disso, o fato de a matriz ser mais negativa do que o espaço intermembrana pode "atrair" a extremidade aminoterminal de carga positiva da pré-proteína, possibilitando a sua entrada na matriz. Para que ocorra translocação, é necessário haver uma estreita aposição nos **locais de contato** entre as membranas externa e interna.

O processo discutido anteriormente descreve a principal via das proteínas destinadas à matriz mitocondrial. Entretanto, algumas proteínas são inseridas na **membrana mitocondrial externa**, facilitadas pelo complexo do TOM. Outras ficam no **espaço intermembrana**, enquanto algumas penetram na **membrana interna**. Outras ainda seguem o seu trajeto até a matriz e, em seguida, retornam à membrana interna ou ao espaço intermembrana. Diversas proteínas contêm duas sequências de sinalização – uma para entrar na matriz mitocondrial, e outra para mediar a relocação subsequente (p. ex., na membrana interna). Certas proteínas mitocondriais carecem de pré-sequências (p. ex., o citocromo *c*, que se localiza no espaço intermembrana), enquanto outras contêm **pré-sequências internas**. Em geral, as proteínas utilizam uma variedade de mecanismos e vias para alcançar o seu destino final nas mitocôndrias.

A **Tabela 46-2** fornece um resumo das características gerais que se aplicam à importação das proteínas dentro das organelas, incluindo as mitocôndrias e algumas das outras organelas que serão discutidas adiante.

TABELA 46-2 Algumas características gerais da importação de proteínas para as organelas

- A importação de uma proteína para uma organela ocorre geralmente em três etapas: reconhecimento, translocação e maturação.
- As sequências de direcionamento presentes na proteína são reconhecidas no citoplasma ou na superfície da organela.
- Em geral, a proteína é desdobrada para translocação, e esse estado é mantido no citoplasma por chaperonas.
- A passagem da proteína através da membrana requer energia e chaperonas das organelas no lado *trans* da membrana.
- Os ciclos de ligação e liberação da proteína à chaperona possibilitam que a cadeia polipeptídica seja arrastada através da membrana.
- Outras proteínas existentes dentro da organela catalisam o dobramento da proteína, fixando frequentemente cofatores ou oligossacarídeos e efetuando a sua montagem em monômeros ou oligômeros ativos.

Fonte: Dados de McNew JA, Goodman JM: The targeting and assembly of peroxisomal proteins: some old rules do not apply. Trends Biochem Sci 1998;21:54. Reimpressa com autorização da Elsevier.

OS SINAIS DE LOCALIZAÇÃO, AS IMPORTINAS E AS EXPORTINAS ESTÃO ENVOLVIDOS NO TRANSPORTE DE MACROMOLÉCULAS PARA DENTRO E PARA FORA DO NÚCLEO

Foi estimado que mais de um milhão de macromoléculas por minuto são transportadas entre o núcleo e o citoplasma em uma célula eucariótica ativa. Essas macromoléculas incluem histonas, proteínas e subunidades ribossomais, fatores de transcrição e moléculas de mRNA. O transporte é bidirecional e ocorre por meio dos **complexos dos poros nucleares** (NPC). Trata-se de estruturas complexas que apresentam uma massa 15 vezes maior que a de um ribossomo e que são constituídas de agregados de cerca de 30 proteínas diferentes. O diâmetro mínimo de um NPC é de aproximadamente 9 nm. As moléculas com menos de 40 kDa podem atravessar o canal do NPC por **difusão**, porém existem **mecanismos de translocação especiais** para as moléculas maiores. Esses mecanismos estão sendo objeto de intensas pesquisas, e algumas características importantes já foram identificadas.

Nesta seção, será descrita, principalmente, a **importação nuclear** de determinadas macromoléculas. O quadro geral que emergiu é o de que as proteínas a serem importadas (molécula de carga) transportam um **sinal de localização nuclear** (**NLS**). Um exemplo de NLS é a sequência de aminoácidos $(Pro)_2$-$(Lys)_{3-}$-Arg-Lys-Val (ver Tabela 46-1), que é significativamente rica em resíduos básicos. Dependendo do NLS que ela possui, uma molécula de carga interage com um membro de uma família de proteínas solúveis denominadas **importinas**, e o complexo assim formado **ancora-se** transitoriamente no NPC. Outra família de proteínas, denominadas **Ran**, desempenha um papel regulador crítico na interação do complexo com o NPC, bem como na sua translocação através desse complexo. As proteínas Ran consistem em **GTPases** nucleares monoméricas pequenas e, à semelhança de outras GTPases, existem nos estados ligado ao GTP ou ligado ao GDP. Essas proteínas Ran são reguladas por **fatores de troca de nucleotídeos de guanina** (**GEF**), que estão localizados no núcleo, e por **proteínas aceleradoras de GTPase** (**GAP**) de Ran, que são predominantemente citoplasmáticas. O estado da Ran ligado ao GTP é favorecido no núcleo, enquanto a forma ligada ao GDP predomina no citoplasma. As conformações e as atividades das moléculas de Ran variam, dependendo da ligação de GTP ou de GDP a essas proteínas (a forma ligada ao GTP é ativa; ver discussão das proteínas G no Capítulo 42). Acredita-se que a **assimetria** entre o núcleo e o citoplasma – no que diz respeito a qual desses dois nucleotídeos está ligado às moléculas de Ran –

seja crucial para compreender as funções da Ran na transferência unidirecional de complexos através do NPC. Quando **moléculas de carga são liberadas dentro do núcleo**, as **importinas recirculam para o citoplasma** para serem novamente utilizadas. A **Figura 46-4** fornece um resumo de algumas das principais características desse processo acima descrito.

Proteínas semelhantes às importinas, designadas como **exportinas,** estão envolvidas na exportação de muitas macromoléculas (várias proteínas, moléculas de tRNA, subunidades ribossomais e certas moléculas de mRNA) presentes no núcleo. As moléculas de carga para exportação apresentam **sinais de exportação nuclear** (**NES**). As proteínas Ran também estão envolvidas nesse processo, e, hoje, está bem estabelecido que os processos de importação e de exportação compartilham certas características. A família das importinas e das exportinas é designada como **carioferinas**.

Outro sistema está envolvido na translocação da maior parte das **moléculas de mRNA**. Essas moléculas são exportadas do núcleo para o citoplasma na forma de complexos de ribonucleoproteína (RNP) fixados a uma proteína denominada **exportador de mRNP**. Trata-se de uma molécula heterodimérica (ou seja, composta de duas subunidades diferentes, TAP e Nxt-1), que transporta moléculas de RNP através do NPC. A Ran não está envolvida. Esse sistema parece utilizar a hidrólise do **ATP** por uma RNA-helicase (Dbp5) para impulsionar a translocação.

Outras **GTPases monoméricas pequenas** (p. ex., ARF, Rab, Ras e Rho) são importantes em diversos processos celulares, como na formação e no transporte de vesículas (ARF e Rab; ver adiante), em determinados processos de crescimento e de diferenciação (Ras) e na formação do citoesqueleto de actina (Rho). Um processo envolvendo o GTP e o GDP também é crucial no transporte de proteínas através da membrana do RE (ver adiante).

AS PROTEÍNAS IMPORTADAS DOS PEROXISSOMOS TRANSPORTAM SEQUÊNCIAS DE DIRECIONAMENTO SINGULARES

O **peroxissomo** é uma organela importante envolvida em certos aspectos do metabolismo de numerosas moléculas, incluindo

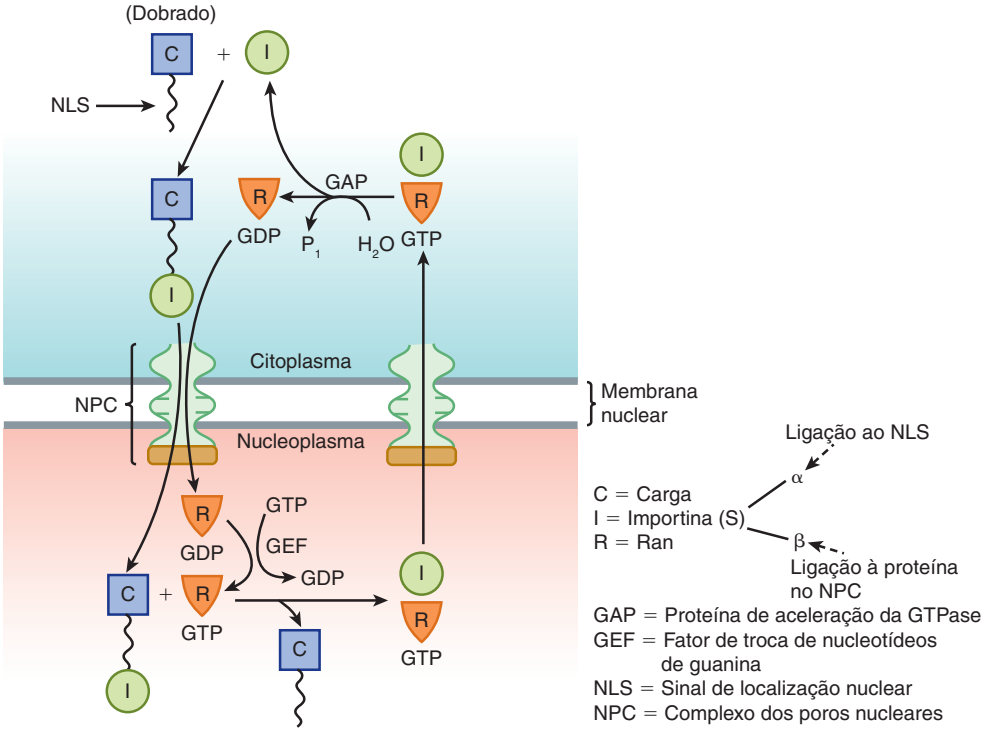


FIGURA 46-4 Representação simplificada da entrada de uma proteína no nucleoplasma. No lado esquerdo superior da figura, uma molécula de carga no citoplasma interage, por meio de seu NLS, formando um complexo com uma importina. (Pode ser uma importina α ou as importinas α e β.) A seguir, esse complexo interage com Ran-GDP e atravessa o NPC no nucleoplasma. No nucleoplasma, a Ran-GDP é convertida em Ran-GTP pelo GEF, provocando uma mudança de conformação da Ran, que resulta na liberação da molécula de carga. Em seguida, o complexo importina-Ran-GTP deixa o nucleoplasma pelo NPC para retornar ao citoplasma. No citoplasma, devido à ação da proteína de aceleração da GTPase (GAP), que converte o GTP em GDP, a importina é liberada para participar de outro ciclo de importação. A Ran-GTP é a forma ativa do complexo, enquanto a forma de Ran-GDP é considerada inativa. Acredita-se que a direcionalidade seja conferida ao processo global pela dissociação da Ran-GTP no citoplasma. (C, molécula de carga; GAP, proteína de aceleração de GTPase; GEF, fator de troca de nucleotídeos de guanina; I, importina, NLS, sinal de localização nuclear; NPC, complexo dos poros nucleares.) (Modificada, com autorização, de Lodish H, et al.: *Molecular Cell Biology,* 6th ed. W.H. Freeman & Co., 2008.)

ácidos graxos e outros lipídeos (p. ex., plasmalogênios, colesterol, ácidos biliares), purinas, aminoácidos e peróxido de hidrogênio. O peroxissomo é delimitado por uma única membrana e contém mais de 50 enzimas; a catalase e a urato-oxidase são enzimas marcadoras dessa organela. Suas proteínas são **sintetizadas nos polirribossomos citosólicos**, e o seu dobramento ocorre antes da importação. As vias de importação de algumas de suas proteínas e enzimas foram estudadas, algumas das quais são **componentes da matriz** (ver **Figura 46-5**), enquanto outras são **componentes da membrana**. Foram descobertas pelo menos duas **sequências de direcionamento da matriz peroxissomal** (**PTS**). Uma delas, a **PTS1,** é um tripeptídeo (ou seja, Ser-Lys-Leu [SKL], porém foram detectadas variações dessa sequência) localizado na extremidade carboxiterminal de diversas proteínas da matriz, incluindo a catalase. A outra, a **PTS2**, está localizada na extremidade N-terminal e foi detectada em pelo menos quatro proteínas da matriz (p. ex., tiolase). Nenhuma dessas duas sequências é clivada após a sua entrada na matriz. As proteínas que contêm sequências PTS1 **formam complexos** com uma proteína receptora citosólica (**Pex5**), enquanto as proteínas que contêm sequências de PTS2 formam complexos com outra proteína receptora. Em seguida, os complexos resultantes interagem com um complexo receptor da membrana, conhecido como **Pex2/10/12,** que transloca esses complexos na matriz. Existem também proteínas envolvidas no transporte subsequente das proteínas matriz. O Pex5 é reciclado para o citosol. Foi constatado que a maioria das **proteínas de membrana** dos peroxissomos não contém as duas sequências de direcionamento citadas anteriormente, mas, aparentemente, apresenta outras sequências. O sistema de importação pode processar **oligômeros intactos** (p. ex., catalase tetramérica). A importação de **proteínas da matriz** requer **ATP**, enquanto a importação de **proteínas da membrana não** exige a sua presença.

A maioria dos casos de síndrome de Zellweger é causada por mutações dos genes envolvidos na biogênese dos peroxissomos

O interesse na importação de proteínas para dentro dos peroxissomos foi estimulado pelos estudos da **síndrome de Zellweger**. Essa doença manifesta-se já na ocasião do nascimento e caracteriza-se por **comprometimento neurológico profundo**, de modo que as vítimas muitas vezes morrem no período de um ano. A quantidade de peroxissomos pode variar, desde um número quase normal até praticamente a sua ausência em alguns pacientes. Os achados bioquímicos consistem em acúmulo de ácidos graxos de cadeia muito longa, anormalidades na síntese dos ácidos biliares e acentuada redução dos plasmalogênios. Acredita-se que o distúrbio seja devido a **mutações** dos genes que codificam determinadas proteínas – as denominadas **peroxinas** – envolvidas em várias etapas da **biogênese dos peroxissomos** (como a importação das proteínas anteriormente descritas), ou dos genes que codificam algumas enzimas peroxissomais. Duas doenças estreitamente relacionadas são a **adrenoleucodistrofia neonatal** e a **doença de Refsum infantil**. A síndrome de Zellweger e essas duas doenças representam um

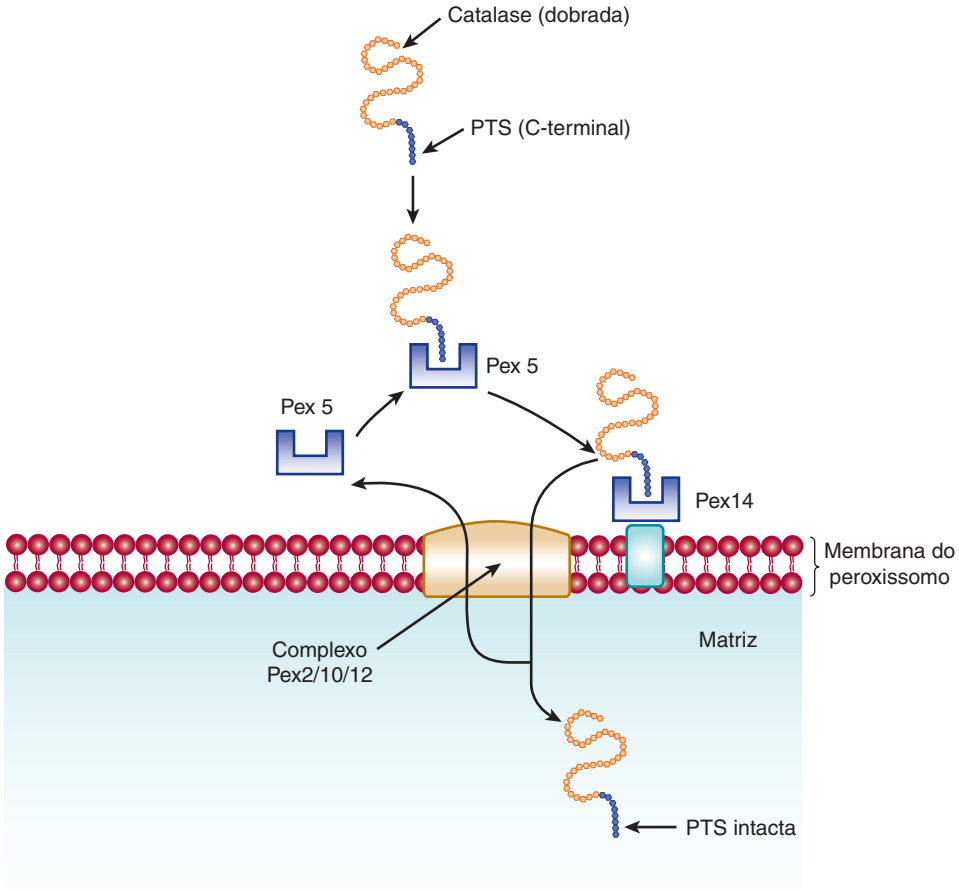


FIGURA 46-5 Representação esquemática da entrada de uma proteína na matriz peroxissomal. A proteína a ser importada na matriz é sintetizada nos polirribossomos citosólicos, assume a sua forma dobrada antes da importação e contém uma sequência de direcionamento peroxissomal (PTS) C-terminal. Interage com a proteína receptora citosólica Pex5, e, em seguida, o complexo interage com um receptor existente na membrana peroxissomal o Pex14. Por sua vez, o complexo proteína-Pex 14 passa para o complexo Pex 2/10/12 na membrana peroxissomal e é translocado. O receptor Pex5 retorna ao citosol. A proteína conserva a sua PTS na matriz. (Modificada, com autorização, de Lodish H, et al.: *Molecular Cell Biology,* 6th ed. W.H. Freeman & Co., 2008.)

espectro de manifestações superpostas, entre as quais a síndrome de Zellweger é a **mais severa** (com muitas proteínas afetadas), enquanto a doença de Refsum infantil é a menos severa (apenas uma ou algumas proteínas afetadas). A **Tabela 46-3** fornece uma lista dessas doenças e de distúrbios relacionados.

A HIPÓTESE DO SINAL EXPLICA COMO OS POLIRRIBOSSOMOS LIGAM-SE AO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

Conforme assinalado, o **ramo do RE rugoso** é o segundo dos dois ramos envolvidos na síntese e seleção das proteínas. Nesse ramo, as proteínas são sintetizadas em **polirribossomos ligados à membrana** e são geralmente **translocadas para o lúmen** do RE rugoso antes de sua seleção subsequente (Figura 46-2). Entretanto, algumas proteínas de membrana são transferidas diretamente na membrana do RE, sem alcançar o lúmen.

A **hipótese do sinal** foi proposta por Blobel e Sabatini, em 1971, em parte para explicar a diferença entre os polirribossomos livres e aqueles ligados à membrana. Com base em alguns achados experimentais, esses pesquisadores propuseram que as proteínas sintetizadas nos polirribossomos ligados à membrana continham uma extensão peptídica N-terminal (**peptídeo sinal N-terminal**), que mediava a sua fixação às membranas do RE, facilitando a sua transferência para o lúmen do RE. Por outro lado, as proteínas cuja síntese ocorre totalmente em polirribossomos livres carecem desse peptídeo sinal. Um aspecto importante da hipótese do sinal foi que ela sugeriu – o que mais tarde foi comprovado – que **todos os ribossomos apresentam a mesma estrutura,** e que a diferença entre ribossomos ligados à membrana e ribossomos livres depende unicamente das proteínas carreadoras dos primeiros, que apresentam peptídeos sinalizadores. Como muitas proteínas de membrana são sintetizadas nos polirribossomos ligados à membrana, a hipótese do sinal desempenha um importante papel nos **conceitos de montagem da membrana**. A **Tabela 46-4** fornece um resumo de algumas **características** dos **peptídeos sinalizadores** N-terminais.

Existem muitas **evidências** que **sustentam** a hipótese do sinal, confirmando que o peptídeo sinal N-terminal está envolvido no processo de translocação através da membrana do RE. Por exemplo, as proteínas mutantes que contêm peptídeos sinalizadores alterados, nos quais os aminoácidos hidrofóbicos são substituídos por aminoácidos hidrofílicos, não são inseridas no lúmen do RE. Proteínas não membrânicas (p. ex., α-globina) às quais foram fixados peptídeos sinalizadores por engenharia genética podem ser inseridas no lúmen do RE ou até mesmo secretadas.

Foram revelados muitos detalhes acerca do processo de translocação do RE

Desde a formulação original da hipótese do sinal, muitos cientistas contribuíram na demonstração de detalhes do processo global de translocação de proteínas nascentes através da membrana do RE para o seu lúmen. A **Tabela 46-5** fornece uma lista de alguns componentes principais do processo global, enquanto a **Figura 46-6** fornece um resumo das principais etapas.

TABELA 46-3 Distúrbios causados por anormalidades dos peroxissomos

	Número OMIM[1]
Síndrome de Zellweger	214100
Adrenoleucodistrofia neonatal	202370
Doença de Refsum infantil	266510
Acidemia hiperpipecólica	239400
Condrodisplasia puntiforme rizomélica	215100
Adrenoleucodistrofia	300100
Pseudoadrenoleucodistrofia neonatal	264470
Pseudossíndrome de Zellweger	261515
Hiperoxalúria tipo 1	259900
Acatalasemia	115500
Deficiência de glutaril-CoA-oxidase	231690

Fonte: Reproduzida, com autorização, de Seashore MR, Wappner RS: *Genetics in Primary Care & Clinical Medicine.* Appleton & Lange, 1996.
[1]OMIM, *Online Mendelian Inheritance in Man*. Cada número especifica uma referência pela qual podem ser encontradas informações sobre cada um dos distúrbios citados.

TABELA 46-4 Algumas propriedades dos peptídeos sinalizadores que direcionam as proteínas para o RE

- Localizados, geralmente, mas nem sempre, na região aminoterminal
- Contêm aproximadamente 12 a 35 aminoácidos
- A metionina frequentemente é o aminoácido aminoterminal
- Contêm um grupo central (~6 a 12) de aminoácidos hidrofóbicos
- A região próxima ao N-terminal apresenta uma carga positiva efetiva
- O resíduo de aminoácido no local de clivagem é variável, porém os resíduos −1 e −3 relacionados ao local de clivagem devem ser pequenos e neutros

TABELA 46-5 Principais componentes envolvidos na translocação do RE

- Peptídeo sinal N-terminal
- Polirribossomos
- SRP, partícula de reconhecimento de sinal
- SRP-R, receptor da partícula de reconhecimento de sinal
- Sec 61, o translocon
- Sinal peptidase
- Proteínas associadas (p. ex., TRAM e TRAP)

TRAM, cadeia de translocação associada à proteína de membrana; TRAP, complexo de proteína associado ao translocon. A TRAM acelera a translocação de certas proteínas. A função do TRAP não está bem esclarecida.

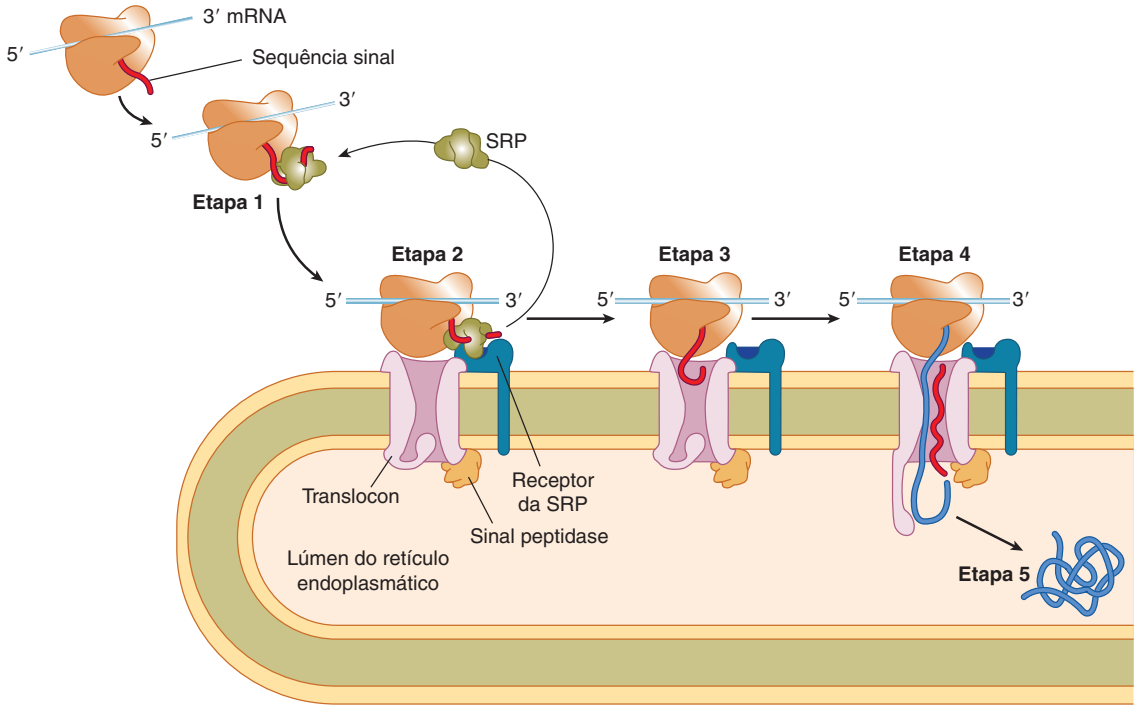


FIGURA 46-6 Endereçamento cotraducional das proteínas secretoras para o RE. Etapa 1: À medida que a sequência sinalizadora emerge do ribossomo, ela é reconhecida e ligada pela partícula de reconhecimento de sinal (SRP). **Etapa 2**: A SRP escolta o complexo até a membrana do RE, onde se liga ao receptor da SRP (SR). **Etapa 3**: A SRP é liberada, o ribossomo liga-se ao translocon, e a sequência de sinal é inserida no canal da membrana. **Etapa 4**: A sequência sinalizadora abre o translocon. A tradução recomeça, e a cadeia polipeptídica em crescimento é translocada através da membrana. **Etapa 5**: A clivagem da sequência sinalizadora pela sinal peptidase libera o polipeptídeo no lúmen do RE. Reproduzida, com autorização, de Cooper GM, Hausman RE: *The Cell: A Molecular Approach*. Sinauer Associates, Inc. 2009.

Etapa 1: A sequência sinalizadora emerge do ribossomo e liga-se à SRP. Essa ligação interrompe temporariamente o alongamento da cadeia polipeptídica (parada do alongamento) após a polimerização de cerca de 70 aminoácidos.

Etapa 2: O complexo SRP-ribossomo-proteína nascente segue o seu trajeto até a membrana do RE, onde se liga ao receptor da SRP (SRP-R). A SRP orienta o complexo para o SR, que impede a expulsão prematura do polipeptídeo em crescimento no citosol.

Etapa 3: A SRP é liberada, a tradução recomeça, o ribossomo liga-se ao translocon (complexo Sec 61), e o peptídeo sinal é inserido no canal no translocon. Enquanto a tradução ainda está ocorrendo, a entrada do peptídeo sinal no translocon e a sua passagem são designadas como translocação cotraducional.

Etapa 4: O peptídeo sinal induz a abertura do canal no translocon pela sua ligação a determinados resíduos hidrofóbicos, induzindo, assim, o movimento da tampa (mostrada na base do translocon na Figura 46-6). Em seguida, o peptídeo em crescimento é totalmente translocado através da membrana, sendo o processo impulsionado pela sua síntese contínua.

Etapa 5: Ocorre clivagem do peptídeo sinal pela sinal-peptidase, e o polipeptídeo/proteína totalmente translocado é liberado no lúmen do RE. O peptídeo sinal é presumivelmente degradado por proteases. Os ribossomos são liberados da membrana do RE e dissociam-se em seus dois tipos de subunidades.

Nas leveduras, muitas proteínas são direcionadas para o RE após a finalização da tradução (**translocação pós-traducional**) por um processo que não exige a presença da SRP. O processo envolve chaperonas citosólicas (como a Hsp70) para manter a proteína desdobrada, bem como a chaperona luminal BiP, que pode "puxar" o polipeptídeo em crescimento para dentro do lúmen do RE. Algumas proteínas de mamíferos também passam por esse processo.

Comentários adicionais sobre a SRP, o receptor da SRP, o GTP, o Sec61 e a glicosilação

A partícula de reconhecimento de sinal (SRP) contém **seis proteínas** e apresenta um **RNA 7S** associado, que está estreitamente relacionado com a família Alu de sequências de DNA muito repetidas (Capítulo 35). Tanto a molécula de RNA quanto as suas proteínas desempenham vários papéis (como a ligação de outras moléculas) em sua função.

O **receptor da SRP** (**SR**) é uma proteína da membrana do RE composta das **subunidades α** e **β**, em que a subunidade β atravessa a membrana do RE de um lado a outro.

A SRP e ambas as subunidades do SR podem ligar-se ao **GTP**. Tanto a SRP quanto o SR precisam estar na forma de GTP para interagir. Quando se ligam, a hidrólise do GTP é estimulada, ocorre liberação da SRP, e o ribossomo liga-se ao translocon, possibilitando a entrada do peptídeo sinal. A SRP e o SR atuam como proteínas de aceleração da GTPase (GAP). Quando o GTP é hidrolisado a GDP, eles se **dissociam**. A SRP e a SR podem ser consideradas como **casamenteiras moleculares**. A SRP apanha

o ribossomo com a sua cadeia nascente e peptídeo sinal exposto, enquanto o SR associa-se ao poro do translocon vazio, provavelmente pela sua subunidade β. O resultado global de sua interação é trazer o ribossomo até o translocon.

O **translocon** consiste em três proteínas de membrana (o **complexo Sec61**), que formam um **canal de condução de proteínas** na membrana do RE, através do qual a proteína recém-sintetizada pode passar. Conforme assinalado anteriormente, o canal parece se **abrir somente na presença de um peptídeo sinal**, preservando a condutância através da membrana do RE quando ela se fecha. A condutância do canal foi quantificada experimentalmente. O fechamento do canal quando não está havendo translocação de proteínas impede o vazamento de íons, como cálcio e outras moléculas, causando disfunção celular.

A inserção do peptídeo sinal dentro do canal de condutância, enquanto a outra extremidade da proteína original ainda está fixada aos ribossomos, é denominada **inserção cotraducional**. O processo de alongamento da parte restante da proteína que está sendo sintetizada provavelmente facilita a passagem da proteína nascente através da bicamada lipídica. É importante que as proteínas sejam mantidas em um **estado desdobrado** antes de entrar no canal de condutância – caso contrário, poderiam não ser capazes de ter acesso ao canal.

As proteínas secretoras e as **proteínas solúveis destinadas às organelas distais ao RE** atravessam completamente a bicamada lipídica da membrana e são descarregadas no lúmen do RE. Muitas proteínas secretoras são N-glicosiladas. As **cadeias de *N*-glicanos**, quando presentes, são acrescentadas pela enzima oligossacarídeo:proteína-transferase (Capítulo 47) à medida que essas proteínas atravessam a parte interna da membrana do RE – processo denominado **glicosilação cotraducional**. Subsequentemente, essas glicoproteínas são encontradas no **lúmen do aparelho de Golgi**, onde ocorrem alterações adicionais nas cadeias de glicano (Figura 47-9), antes da distribuição intracelular ou secreção.

Em contrapartida, as proteínas incorporadas nas **membranas do RE**, bem como em **outras membranas** ao longo da via secretora sofrem apenas **translocação parcial** através da membrana do RE (ver adiante). São capazes de se inserir na membrana do RE por transferência lateral através da parede do translocon.

Há evidências de que a membrana do RE esteja envolvida no **transporte retrógrado** de várias moléculas do lúmen do RE para **o citosol**. Essas incluem glicoproteínas desdobradas ou dobradas de maneira imprópria, glicopeptídeos e oligossacarídeos. Pelo menos algumas moléculas são **degradadas nos proteassomos** (ver adiante). A participação do translocon na retrotranslocação não está bem esclarecida; um ou mais canais adicionais podem estar envolvidos. Qualquer que seja o caso, existe um **tráfego bidirecional** através da membrana do RE.

AS PROTEÍNAS SEGUEM VÁRIOS CAMINHOS PARA A SUA INSERÇÃO OU FIXAÇÃO NAS MEMBRANAS DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

A seguir, são descritos os caminhos que as proteínas percorrem para a sua inserção nas membranas do RE.

Inserção cotraducional

A **Figura 46-7** ilustra diversas maneiras pelas quais as proteínas são distribuídas nas membranas. Em particular, as regiões **aminoterminais** de determinadas proteínas (p. ex., o receptor de LDL) podem ser encontradas na superfície extracitoplasmática, enquanto as regiões **carboxiterminais** de outras proteínas (p. ex., o receptor de assialoglicoproteínas) estão nessa superfície. Para explicar essas disposições, é preciso considerar os eventos iniciais de biossíntese na membrana do RE. O **receptor de LDL** entra na membrana do RE por um processo análogo ao de uma proteína secretora (Figura 46-6); ele atravessa parcialmente a membrana do RE, seu peptídeo sinal é clivado, e a sua região aminoterminal faz protrusão no lúmen (ver também a Figura 46-13). Todavia, fica retido na membrana, visto que ele contém um segmento altamente hidrofóbico, conhecido como sinal de transferência de bloqueio ou parada (comparar com a **Figura 46-8**). Essa sequência forma o único segmento transmembrana da proteína e constitui o seu domínio de ancoragem à membrana. A pequena área da membrana do RE onde o receptor de LDL recém-sintetizado se localiza posteriormente é retirada, passando a constituir um componente da vesícula

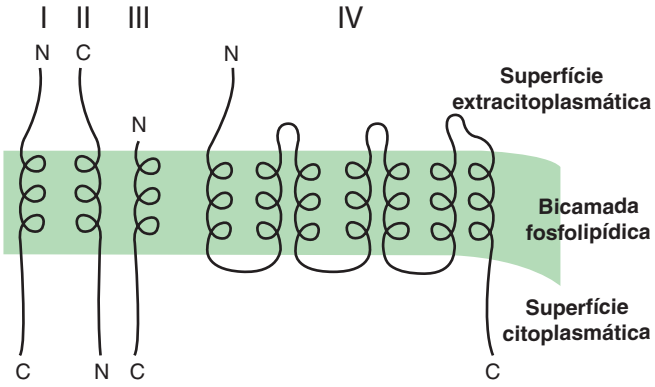


FIGURA 46-7 Variações nos mecanismos pelos quais as proteínas são inseridas dentro das membranas. Esta representação esquemática, que ilustra várias orientações possíveis, mostra os segmentos das proteínas dentro da membrana sob a forma de hélices α, e os outros segmentos sob a forma de linhas. As orientações formam-se inicialmente na membrana do RE. As proteínas transmembrana do tipo I (p. ex., o receptor de LDL e a hemaglutinina da *influenza*) atravessam uma vez a membrana e têm as suas regiões aminoterminais na face exterior da membrana. As proteínas transmembrana do tipo II (p. ex., os receptores de assialoglicoproteína e transferrina) também atravessam uma única vez a membrana, porém as suas regiões C-terminais estão no lado externo. As proteínas transmembrana tipo III (p. ex., o citocromo P450) exibem uma disposição semelhante àquela das proteínas do tipo I, porém não contêm um peptídeo sinal passível de clivagem. As proteínas transmembrana do tipo IV (p. ex., os receptores acoplados à proteína G e os transportadores de glicose) atravessam várias vezes a membrana (7 vezes no receptor acoplado à proteína G e 12 vezes nos transportadores de glicose); são também denominadas proteínas politópicas de membrana. (C, carboxiterminal; N, aminoterminal.) (Adaptada, com autorização, de Wickner WT, Lodish HF (1985), "Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes". Science 230:400. Reimpressa com autorização da AAAS.)

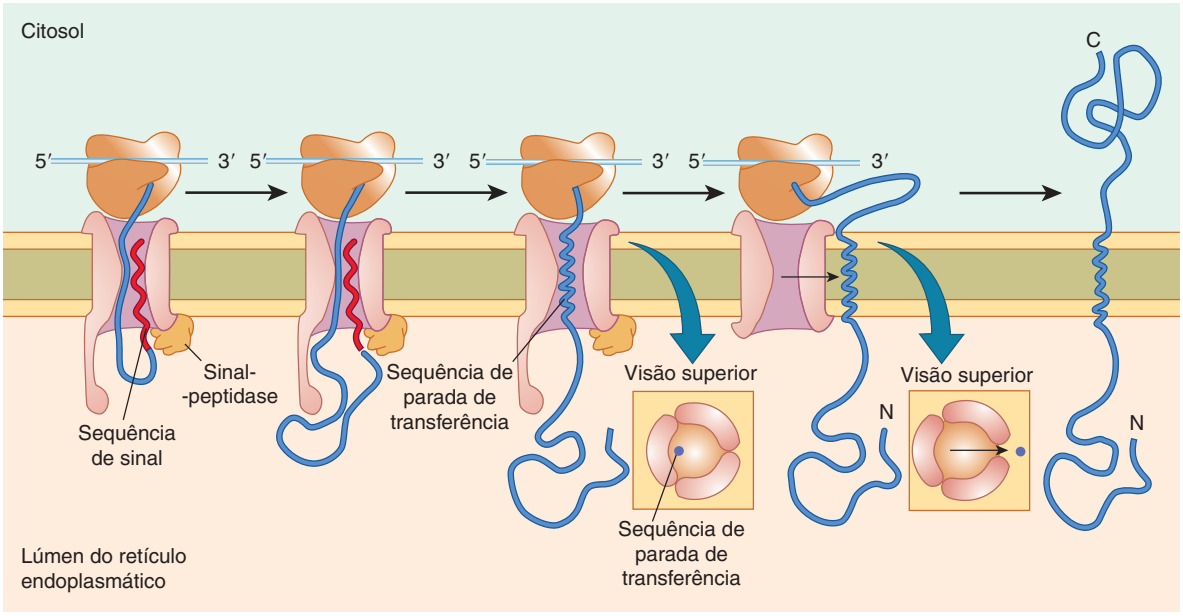


FIGURA 46-8 Inserção de uma proteína de membrana com uma sequência de sinal passível de clivagem e uma única sequência de parada da transferência. A sequência de sinal é clivada à medida que a cadeia polipeptídica atravessa a membrana, de modo que a região aminoterminal da cadeia polipeptídica fica exposta no lúmen do RE. Entretanto, a translocação da cadeia polipeptídica através da membrana é interrompida quando o translocon reconhece uma sequência de parada de transferência transmembrana. Isso determina o fechamento do translocon e possibilita a saída da proteína do canal lateralmente, a qual se ancora na membrana do RE. A continuação da tradução resulta em uma proteína que atravessa a membrana, com a sua região carboxiterminal no lado citosólico. Reproduzida, com autorização, de Cooper GM Hausman RE: *The Cell: A Molecular Approach*. Sinauer Associates, Inc. 2009.

de transporte. Conforme descrito adiante, na discussão sobre a assimetria das proteínas e dos lipídeos na montagem da membrana, a disposição do receptor na membrana do RE é preservada na vesícula (ver Figura 46-13), que, finalmente, se funde com a membrana plasmática. Em contrapartida, o **receptor de assialoglicoproteína** carece de um peptídeo sinal N-terminal passível de clivagem, porém possui uma sequência de inserção interna, que é introduzida na membrana, mas que não é clivada. Essa sequência atua como âncora, e a sua região carboxiterminal é expulsa através da membrana. A disposição mais complexa de um **transportador** (p. ex., da glicose) pode ser explicada pelo fato de que as hélices α transmembrana alternadas atuam como sequências de inserção não clivadas e como sinais de bloqueio de transferência, respectivamente. Cada par de segmentos helicoidais é inserido como um grampo de cabelo. As sequências de determinam a estrutura de uma proteína em uma membrana são denominadas **sequências topogênicas.** Conforme explicado na legenda da Figura 46-7, as três proteínas citadas anteriormente fornecem exemplos de proteínas transmembrana do tipo I, tipo II e tipo IV, enquanto o **citocromo P450** é um membro do tipo III.

Síntese dos polirribossomos livres e fixação pós-traducional à membrana do retículo endoplasmático

Um exemplo é o **citocromo b_5**, que parece entrar diretamente na membrana do RE após tradução, auxiliado por várias chaperonas.

Outros caminhos incluem a retenção no AG, com recuperação para o RE, bem como transporte retrógrado a partir do AG

Diversas proteínas apresentam a sequência de aminoácidos **KDEL** (Lys-Asp-Glu-Leu) em sua região carboxiterminal (ver Tabela 46-1). As proteínas que contêm KDEL dirigem-se inicialmente ao **AG**, em vesículas de transporte COPII (ver adiante) e interagem, no AG, com uma proteína receptora específica de KDEL, que as retêm transitoriamente. Em seguida, **retornam nas vesículas de transporte COPI ao RE**, onde se dissociam do receptor e, assim, são recuperadas. A sequência HDEL (H = histidina) tem uma finalidade semelhante. Os processos descritos anteriormente resultam na localização final de certas proteínas solúveis no lúmen do RE.

Algumas outras **proteínas que não contêm KDEL** também passam para o aparelho de Golgi e, em seguida, retornam por **transporte vesicular retrógrado** ao RE, onde são inseridas. Essas proteínas incluem componentes da vesícula que precisam ser reciclados, bem como algumas proteínas da membrana do RE. Com frequência, essas proteínas possuem um sinal C-terminal localizado no citosol, rico em resíduos básicos.

Os parágrafos anteriores demonstraram que existe uma **variedade de caminhos** envolvidos na montagem das proteínas das membranas do RE. Uma situação semelhante provavelmente ocorre com outras membranas (p. ex., as membranas mitocondriais e a membrana plasmática). Foram identificadas sequências precisas de endereçamento em alguns casos (p. ex., as sequências KDEL).

O tópico da biogênese das membranas é discutido de modo mais pormenorizado em seções subsequentes deste capítulo.

AS CHAPERONAS SÃO PROTEÍNAS QUE IMPEDEM O DOBRAMENTO DEFEITUOSO E AS INTERAÇÕES IMPRODUTIVAS DE OUTRAS PROTEÍNAS

As **chaperonas moleculares** já foram mencionadas neste capítulo. A **Tabela 46-6** fornece uma lista de várias propriedades importantes dessas proteínas, enquanto a **Tabela 46-7** fornece uma lista dos nomes de algumas chaperonas dessas proteínas de importância particular no RE. Basicamente, elas **estabilizam os intermediários desdobrados ou parcialmente dobrados**, proporcionando-lhes tempo suficiente para o seu dobramento apropriado, e impedem a ocorrência de interações inadequadas, combatendo, assim, a formação de estruturas não funcionais. As chaperonas exibem, em sua maioria, **atividade de ATPase** e ligam-se ao ADP e ao ATP. Essa atividade é importante para o seu efeito no dobramento das proteínas. O complexo ADP-chaperona frequentemente exibe alta afinidade pela proteína desdobrada que, quando ligada, estimula a liberação de ADP, com substituição pelo ATP. Por sua vez, o complexo ATP-chaperona libera os segmentos da proteína que foram dobrados de maneira apropriada, e, assim, o **ciclo** envolvendo a ligação de ADP e de ATP é repetido até a liberação da proteína.

As **chaperoninas** constituem a segunda classe importante de chaperonas. Formam **estruturas** complexas **semelhantes a um barril**, em que uma proteína desdobrada é sequestrada de outras proteínas, fornecendo-lhe tempo suficiente e condições apropriadas para o seu dobramento correto. A estrutura da chaperonina bacteriana GroEL foi estudada detalhadamente. É polimérica, possui duas estruturas semelhantes a anéis, cada uma composta de sete subunidades idênticas, e, novamente, o ATP está envolvido em sua ação.

Vários exemplos de chaperonas foram citados anteriormente durante a descrição da seleção das proteínas mitocondriais. A **proteína de ligação da cadeia pesada da imunoglobulina** (**BiP**) está localizada no lúmen do RE. Essa proteína **promove o dobramento apropriado ao obstruir a agregação** e liga-se temporariamente às cadeias pesadas de imunoglobulina e muitas outras proteínas anormalmente dobradas, impedindo que deixem o RE. Outra chaperona importante é a **calnexina**, uma proteína de ligação do cálcio localizada na membrana do RE. Essa proteína liga-se a uma ampla variedade de proteínas, inclusive aos antígenos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e a uma variedade de proteínas plasmáticas. Conforme descrito no Capítulo 47, a calnexina liga-se às espécies monoglicosiladas das glicoproteínas que ocorrem durante o processamento das glicoproteínas, conservando-as no RE até que haja dobramento apropriado da glicoproteína. A **calreticulina**, que também é uma proteína de ligação do cálcio, exibe propriedades semelhantes às da calnexina, porém não está ligada à membrana. As chaperonas não são as únicas proteínas no lúmen do RE que estão relacionadas com o dobramento apropriado das proteínas. Existem duas **enzimas** que desempenham um papel ativo no dobramento. A **proteína dissulfeto isomerase** (**PDI**) promove a **rápida formação** e o rearranjo das ligações dissulfeto até que seja obtida a combinação correta. A **peptidil prolil-isomerase** (**PPI**) acelera o dobramento das proteínas que contêm prolina, catalisando a isomerização *cis-trans* das ligações X-Pro, onde X representa qualquer resíduo de aminoácido.

Assim, o RE funciona como um **compartimento de controle de qualidade** da célula. As proteínas recém-sintetizadas procuram se dobrar com o auxílio das chaperonas e de enzimas de dobramento, e seu estado de dobramento é monitorado pelas chaperonas. As proteínas dobradas de modo impróprio ou com dobramento incompleto interagem com as chaperonas, que as retêm no RE, impedindo que sejam exportadas a seus destinos finais. Se essa interação continuar por um período prolongado de tempo, as proteínas dobradas de modo impróprio são habitualmente eliminadas por degradação associada ao retículo endoplasmático (ERAD, ver adiante). Isso impede o acúmulo prejudicial de proteínas com dobramento incorreto. Em várias doenças genéticas, como a fibrose cística (ver Capítulo 57), ocorre retenção de proteínas dobradas de modo incorreto no RE. Em alguns casos, as proteínas retidas ainda exibem alguma atividade funcional. Conforme discutido mais adiante neste capítulo, existe, no momento atual, um grande interesse na descoberta de fármacos capazes de interagir com essas proteínas e de promover o seu dobramento correto e exportação do RE.

TABELA 46-6 Algumas propriedades das proteínas chaperonas

• Ocorrem em uma ampla gama de espécies, desde bactérias a seres humanos
• Muitas são denominadas proteínas do choque térmico (Hsp)
• Algumas são induzíveis por condições que causam o desdobramento das proteínas recém-sintetizadas (p. ex., temperatura elevada e várias substâncias químicas)
• Ligam-se predominantemente a regiões hidrofóbicas das proteínas desdobradas e impedem a sua agregação
• Atuam, em parte, como mecanismos de controle de qualidade ou de edição para a detecção de proteínas dobradas de maneira imprópria ou defeituosas
• As chaperonas exibem, em sua maioria, atividade de ATPase associada, estando o ATP ou o ADP envolvidos na interação proteína-chaperona
• São encontradas em vários compartimentos celulares, como o citosol, as mitocôndrias e o lúmen do retículo endoplasmático

TABELA 46-7 Algumas chaperonas e enzimas envolvidas no dobramento, localizadas no retículo endoplasmático rugoso

• BIP (proteína de ligação da cadeia pesada da imunoglobulina)
• GRP94 (proteína regulada pela glicose)
• Calnexina
• Calreticulina
• PDI (proteína dissulfeto isomerase)
• PPI (peptidil prolil *cis-trans*-isomerase)

O ACÚMULO DE PROTEÍNAS DOBRADAS DE MODO INAPROPRIADO NO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO PODE INDUZIR A RESPOSTA ÀS PROTEÍNAS DESDOBRADAS (UPR)

A manutenção da **homeostasia do RE** é importante para a função celular normal. Quando o ambiente singular no interior do lúmen do RE é afetado (p. ex., alterações do Ca^{2+} do RE, alterações do estado redox, exposição a várias toxinas ou a alguns vírus), essa situação pode levar a uma capacidade reduzida de dobramento das proteínas, com acúmulo de proteínas dobradas de modo inapropriado. O acúmulo de proteínas dobradas de maneira incorreta no RE é designado como **estresse do RE**. A célula desenvolveu então um mecanismo, denominado UPR, para perceber os níveis de proteínas com dobramento inapropriado e iniciar mecanismos de sinalização intracelular para compensar as condições de estresse e restaurar a homeostasia do RE. A UPR é iniciada por sensores de estresse do RE, os quais são proteínas transmembrana inseridas na membrana do RE. A ativação desses sensores de estresse produz três efeitos principais: (i) inibição transitória da tradução para reduzir a quantidade de proteínas recém-sintetizadas, (ii) indução de uma resposta transcricional, que leva a um aumento na expressão das chaperonas do RE, e (iii) síntese aumentada de proteínas envolvidas na degradação das proteínas do RE com dobramento inapropriado (discutidas adiante). Desse modo, a UPR aumenta a capacidade de dobramento do RE e impede o acúmulo de produtos proteicos improdutivos e potencialmente tóxicos, além de outras respostas para restaurar a homeostasia celular. Entretanto, se o dobramento inadequado persistir, são ativadas as vias de morte celular (apoptose). Uma compreensão mais profunda da UPR provavelmente irá fornecer novas abordagens ao tratamento de doenças nas quais ocorrem estresse do RE e dobramento defeituoso de proteínas (ver **Tabela 46-8**).

AS PROTEÍNAS MAL DOBRADAS SOFREM DEGRADAÇÃO ASSOCIADA AO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

Conforme apresentado na Tabela 46-8, ocorrem proteínas dobradas de modo incorreto em muitas doenças genéticas. As proteínas mal dobradas no RE são seletivamente **transportadas de volta através do RE** (**retrotranslocação ou deslocamento**) para entrar nos **proteassomos** presentes no citosol. A via precisa pela qual as proteínas dobradas de modo incorreto voltam a atravessar a membrana do RE ainda se encontra em fase de pesquisa. Duas proteínas foram implicadas: o complexo Sec61, descrito anteriormente, e a Derlina 1. A energia para a translocação parece ser, pelo menos em parte, suprida por **p97,** uma AAA-ATPase (uma de uma família das **A**TPases **A**ssociadas a várias **A**tividades celulares). As **chaperonas** presentes no lúmen do RE (p. ex., BiP) e no citosol ajudam a direcionar as proteínas dobradas incorretamente para os proteassomos. Antes de sua entrada nos proteassomos, as proteínas são, em sua maioria, **ubiquitinadas** (ver parágrafo seguinte) e escoltadas até os proteassomos por proteínas de ligação

TABELA 46-8 Algumas doenças conformacionais que são causadas por anormalidades no transporte intracelular de proteínas específicas e enzimas devido a mutações[1]

Doença	Proteína afetada
Deficiência de α_1-Antitripsina com doença hepática (OMIM107400)	α_1-Antitripsina
Síndrome de Chediak-Higashi (OMIM 214500)	Regulador do tráfego lisossomal
Deficiência combinada dos fatores V e VIII (OMIM 227300)	ERGIC53, uma lectina de ligação da manose
Fibrose cística (OMIM 219700)	CFTR
Diabetes melito [alguns casos] (OMIM 147670)	Receptor de insulina (subunidade α)
Hipercolesterolemia familiar, autossômica dominante (OMIM 143890)	Receptor de LDL
Doença de Gaucher (OMIM 230800)	β-Glicosidase
Hemofilia A (OMIM 306700) e B (OMIM 306900)	Fatores VIII e IX
Hemocromatose hereditária (OMIM 235200)	HFE
Síndrome de Hermansky-Pudlak (OMIM 203300)	Complexo adaptador AP-3, subunidade β3A
Doença da célula I (OMIM 252500)	*N*-acetilglicosamina-1--fosfotransferase
Síndrome oculocerebrorrenal de Lowe (OMIM 309000)	PIP_2-5-fosfatase
Doença de Tay-Sachs (OMIM 272800)	β-Hexosaminidase
Doença de von Willebrand (OMIM 193400)	Fator de von Willebrand

Abreviatura: PIP_2, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato.
Nota: O leitor deve consultar livros de medicina ou pediatria para informações sobre as manifestações clínicas das doenças listadas.
[1]Ver Schroder M, Kaufman RJ: The mammalian unfolded protein response. Annu Rev Biochem 2005;74:739 and Olkonnen V, Ikonen E: Genetic defects of intracellular membrane transport. N Engl J Med 2000;343:10095.

de poliubiquitina. Existem ubiquitina-ligases na membrana do RE. O processo descrito anteriormente é designado como ERAD e está esquematizado de maneira resumida na **Figura 46-9**.

A UBIQUITINA É UMA MOLÉCULA-CHAVE NA DEGRADAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Nos eucariotos, existem duas vias principais de degradação das proteínas. Uma delas envolve **proteases lisossomais** e não requer a presença de ATP. A outra via envolve a **ubiquitina** e depende de ATP. Esta última desempenha um importante papel na degradação das proteínas e está particularmente associada à **eliminação de proteínas e enzimas reguladoras dobradas de modo incorreto**, **que apresentam meias-vidas curtas**. As pesquisas sobre a ubiquitina aumentaram rapidamente, e sabe-se que ela está envolvida na **regulação do ciclo celular** (degradação das ciclinas), no **reparo do**

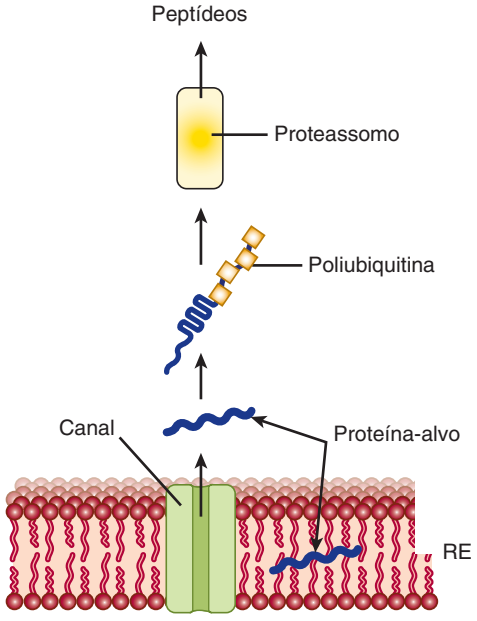


FIGURA 46-9 Ilustração esquemática simplificada dos eventos na ERAD. Uma proteína-alvo que está mal dobrada sofre transporte retrógrado através da membrana do RE para o citosol, onde é submetida à poliubiquitinação. Após a poliubiquitinação, a proteína entra no proteassomo, no interior do qual é degradada em peptídeos pequenos, que saem e podem ter vários destinos. As moléculas de ubiquitina liberadas são recicladas. Duas proteínas foram implicadas no transporte retrógrado através do RE: o Sec61 (também envolvido na transferência de proteínas recém-sintetizadas no lúmen do RE) e outra proteína, denominada Derlina 1.

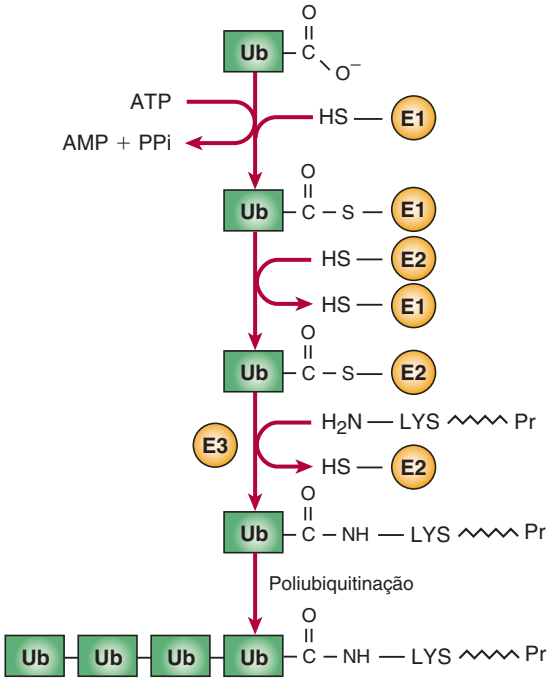


FIGURA 46-10 Sequência das reações na adição da ubiquitina a uma proteína-alvo. Na reação catalisada pela E1, o grupo COO^- C-terminal da ubiquitina liga-se, por uma ligação tioéster a um grupo SH da E1. Na reação catalisada pela E2, a ubiquitina ativada é transferida a um grupo SH da E2. Na reação catalisada pela E3, a ubiquitina é transferida da E2 para um grupo ε-amino de uma lisina da proteína-alvo. Em seguida, ciclos adicionais de ubiquitinação produzem a cadeia de poliubiquitina. (Ub, ubiquitina, E1, enzima de ativação; E2, enzima de conjugação; E3, ligase; LYS〰Pr, proteína-alvo.)

DNA, na **ativação do NFκB** (ver Capítulo 50), na **perda muscular**, nas **infecções virais** e em **muitos outros** processos fisiológicos e patológicos importantes. A ubiquitina é uma **proteína pequena** (com 76 aminoácidos) **altamente conservada**, que desempenha um papel essencial na **marcação** de várias proteínas para **degradação** subsequente nos **proteassomos**. O mecanismo de fixação da ubiquitina a uma proteína-alvo (p. ex., uma forma mal dobrada de CFTR, a proteína envolvida na etiologia da fibrose cística; ver Capítulos 40 e 57) está ilustrado na **Figura 46-10** e envolve **três enzimas**: uma **enzima de ativação**, uma **enzima de conjugação** e uma **ligase**. Existem vários tipos de enzimas de conjugação e, surpreendentemente, algumas centenas de ligases diferentes. Estas últimas enzimas são as que conferem especificidade de substrato. Quando a molécula de ubiquitina está ligada à proteína, várias outras também se ligam, resultando em uma **proteína-alvo poliubiquitinada**. Foi estimado que é necessário um **mínimo de quatro moléculas de ubiquitina** ligadas para condicionar uma molécula-alvo à degradação em um proteassomo. A ubiquitina pode ser **clivada** da proteína-alvo por **enzimas** de desubiquitinação, podendo a ubiquitina liberada ser reutilizada.

As proteínas ubiquitinadas são degradadas nos proteassomos

As proteínas-alvo poliubiquitinadas entram nos proteassomos localizados no citosol. O proteassomo é uma **estrutura cilíndrica** relativamente **grande**, e é composto de cerca de **50 subunidades.** O proteassomo tem um **cerne** oco e uma ou duas **tampas** que desempenham um papel regulador. As proteínas-alvo são **desdobradas** por ATPases presentes nas tampas do proteassomo. Os proteassomos podem hidrolisar uma variedade muito ampla de ligações peptídicas. As proteínas-alvo passam para o cerne, onde são degradadas em pequenos peptídeos, que em seguida saem do proteassomo (ver Figura 46-9) para degradação subsequente por peptidases citosólicas. Proteínas com dobramento tanto normal quanto anormal são substratos para o proteassomo. As moléculas de ubiquitina liberadas são recicladas. O proteassomo desempenha um importante papel na **apresentação de peptídeos pequenos** produzidos pela **degradação de vários vírus** e outras moléculas, até **moléculas de histocompatibilidade principal da classe I**, etapa fundamental na apresentação dos antígenos aos linfócitos T.

AS VESÍCULAS DE TRANSPORTE SÃO FUNDAMENTAIS NO TRÁFEGO INTRACELULAR DAS PROTEÍNAS

As proteínas que são sintetizadas nos polirribossomos ligados à membrana e destinadas ao AG ou à MP alcançam esses locais

dentro de vesículas de **transporte**. As vesículas envolvidas no **transporte anterógrado** (COPII) do RE para o AG e no **transporte retrógrado** (COPI) do AG para o RE não apresentam clatrina. As vesículas de transporte e as vesículas secretoras que transportam uma carga do AG para a MP também são livres de clatrina. As vesículas envolvidas na endocitose (ver discussão do receptor de LDL nos Capítulos 25 e 26) são revestidas de clatrina, assim como algumas vesículas que transportam carga até os lisossomos. Para maior clareza, as vesículas não revestidas de clatrina são designadas, neste texto, como **vesículas de transporte**. A **Tabela 46-9** fornece um resumo dos **tipos** e das **funções** das principais vesículas identificadas até o momento.

O modelo de vesículas de transporte envolve SNARE e outros fatores

As **vesículas** ocupam uma posição central no transporte intracelular de muitas proteínas. Foram efetuados avanços significativos na compreensão dos eventos envolvidos na formação e no transporte das vesículas. Essas informações foram obtidas em consequência do uso de várias abordagens. Em particular, o uso de **abordagens genéticas para o estudo** das vesículas em leveduras por Schekman e colaboradores e o desenvolvimento de **sistemas acelulares** por Rothman e colaboradores para estudar a formação das vesículas foram cruciais. Por exemplo, é possível observar por microscopia eletrônica o brotamento das vesículas a partir de preparações de Golgi incubadas com citosol, ATP e GTP-. O mecanismo global é complexo, com a sua própria **nomenclatura** (**Tabela 46-10**), e envolve uma variedade de proteínas do citosol e da membrana, GTP, ATP e fatores acessórios. **O brotamento**, **a fixação**, **a ancoragem** e a **fusão com a membrana** constituem etapas fundamentais no ciclo de vida das vesículas, em que Sar, ARF e Rab GTPases (ver adiante) atuam como **interruptores moleculares**.

TABELA 46-9 Alguns tipos de vesículas e suas funções

Vesícula	Função
COPI	Envolvida no transporte intragolgi e no transporte retrógrado do AG para o RE
COPII	Envolvida na exportação a partir do RE para o ERGIC ou o AG
Clatrina	Envolvida no transporte em localizações pós-AG, incluindo a MP, a TGN e os endossomos
Vesículas secretoras	Envolvidas na secreção regulada de órgãos como o pâncreas (p. ex., secreção de insulina)
Vesículas da TGN para a MP	Transportam proteínas até a MP e também estão envolvidas na secreção constitutiva

Abreviaturas: AG, aparelho de Golgi; RE, retículo endoplasmático; ERGIC, compartimento intermediário REAG; MP, membrana plasmática; TGN, rede *trans*-Golgi.
Nota: Cada vesícula tem seu próprio conjunto de proteínas de revestimento. A clatrina está associada a várias proteínas adaptadoras, como AP-1, AP-2 e AP-3 (AP, proteína adaptadora), GGA-1, GGA-2 e GGA-3 (GGA, domínio de homologia *ear* de gama-adaptina de localização no Golgi, proteína de ligação de ARF), formando diferentes tipos de vesículas com clatrina. Essas várias vesículas com clatrina apresentam diferentes alvos intracelulares. As proteínas das vesículas secretoras e das vesículas envolvidas no transporte do AG para a MP não estão bem caracterizadas, nem os mecanismos envolvidos na sua formação e destino.

TABELA 46-10 Alguns fatores envolvidos na formação das vesículas não revestidas de clatrina e seu transporte

- ARF: fator de ADP-ribosilação, uma GTPase envolvida na formação de COPI e também das vesículas revestidas de clatrina.
- Proteínas de revestimento: uma família de proteínas encontradas nas vesículas revestidas. As diferentes vesículas de transporte apresentam complementos diferentes de proteínas de revestimento.
- NSF: fator sensível à NEM, uma ATPase.
- Sar1: uma GTPase que desempenha um papel-chave na montagem das vesículas COPII.
- Sec12: um fator de troca de nucleotídeo de guanina (GEF) que efetua a interconversão de Sar1·GDP e Sar1·GTP.
- α-SNAP: proteína de fixação de NSF solúvel. Juntamente com o NSF, essa proteína está envolvida na dissociação de complexos SNARE.
- SNARE: receptor de SNAP. As SNARE são moléculas essenciais na fusão das vesículas com membranas aceptoras.
- t-SNARE: SNARE alvo.
- v-SNARE: SNARE da vesícula.
- Proteínas Rab: uma família de proteínas relacionadas com Ras (GTPases monoméricas) observadas pela primeira vez no cérebro do rato. São ativas quando o GTP está ligado. Diferentes moléculas de Rab atracam vesículas diferentes às membranas aceptoras.
- Proteínas efetoras de Rab: uma família de proteínas que interagem com moléculas de Rab; algumas atuam para fixar as vesículas às membranas aceptoras.

Existem etapas gerais comuns na formação das vesículas de transporte, direcionamento das vesículas e fusão com uma membrana-alvo, independentemente da membrana a partir da qual a vesícula se forma ou de seu destino intracelular. A natureza das proteínas de revestimento, as GTPases e os fatores-alvo diferem, dependendo do local de formação da vesícula e de seu destino final. O transporte do RE para o aparelho de Golgi é o exemplo mais bem estudado e será utilizado para ilustrar essas etapas. O **transporte anterógrado da vesícula** do RE para o aparelho de Golgi envolve as **vesículas COPII**, e pode-se considerar que o processo ocorre em oito etapas (**Figura 46-11**). O conceito básico é o de que cada vesícula de transporte é carregada com uma carga específica, bem como com uma ou mais proteínas **v-SNARE** que dirigem o endereçamento. Cada membrana-alvo apresenta uma ou mais **proteínas t-SNARE complementares**, com as quais as primeiras interagem, mediando a fusão vesícula-membrana dependente da proteína SNARE. Além disso, as **proteínas Rab** também ajudam a direcionar as vesículas para membranas específicas e estão envolvidas na fixação, antes da ancoragem da vesícula em uma membrana-alvo.

Etapa 1: O **brotamento** é iniciado quando a **Sar1** é ativada pela ligação ao GTP, que é trocado pelo GDP por meio da ação do **Sec12**. Isso produz uma mudança na conformação de Sar1·GTP, inserindo-o na membrana do RE para formar um ponto específico para a montagem da vesícula.

Etapa 2: Várias **proteínas de revestimento** ligam-se ao **Sar1·GTP**. Por sua vez, as proteínas de carga da membrana

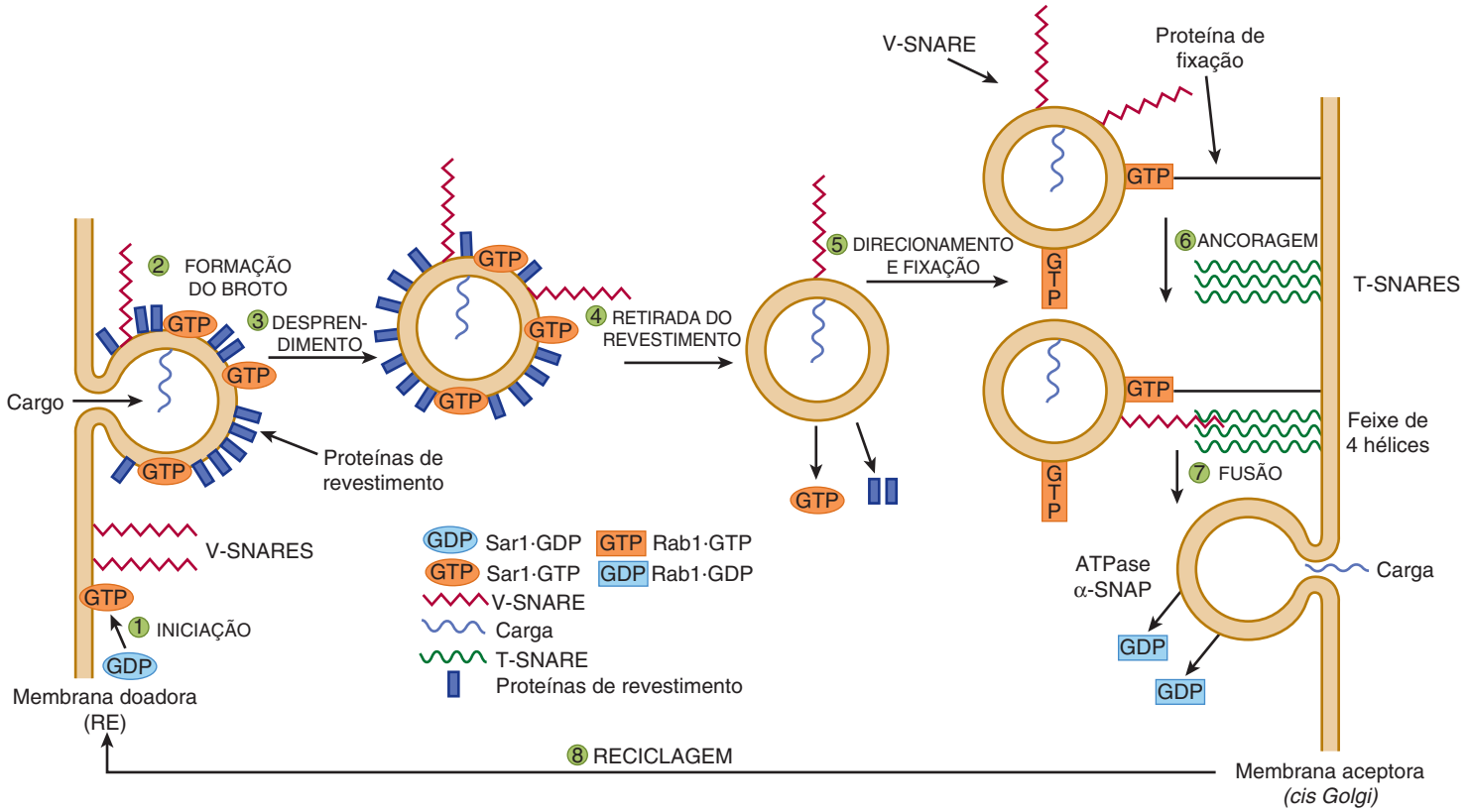


FIGURA 46-11 Modelo das etapas de um ciclo de transporte anterógrado envolvendo vesículas COPII. O ciclo começa no lado esquerdo inferior da figura, onde a molécula de Sar1·GDP é representada por uma figura oval azul marcada com GDP. As etapas do ciclo são descritas no texto. Os vários componentes estão descritos de modo sucinto na Tabela 46-8. Os papéis da proteína Rab e da proteína efetora Rab (ver o texto) no processo global não estão indicados nesta figura. (Adaptada, com autorização, de Rothman JE: Mechanisms of intracellular protein transport. Nature 1994;372:55.)

ligam-se às proteínas de revestimento, e as proteínas de carga solúveis dentro das vesículas ligam-se às regiões receptoras das primeiras. Outras proteínas de revestimento são reunidas para a **formação completa do broto**. As proteínas de revestimento promovem o brotamento, contribuem para a curvatura dos brotos e também ajudam a selecionar as proteínas.

Etapa 3: O **broto se desprende**, completando a formação da vesícula revestida. A curvatura da membrana do RE e as interações proteína-proteína e proteína-lipídeo no broto facilitam o desprendimento dos locais de saída do RE.

Etapa 4: A **desmontagem do revestimento** (que envolve a **dissociação** de **Sar1** e a **camada** das proteínas de revestimento) ocorre após a **hidrólise do GTP ligado a GDP** por Sar1, um processo promovido por uma proteína de revestimento específica. Por conseguinte, a Sar1 desempenha um papel essencial tanto na montagem quanto na dissociação das proteínas de revestimento. A retirada do revestimento é necessária para que ocorra fusão.

Etapa 5: O **direcionamento da vesícula** é obtido pela ligação de moléculas de **Rab** às vesículas. As moléculas de Rab·GDP no citosol são convertidas em moléculas de Rab·GTP por um GEF específico, e elas se fixam às vesículas. Subsequentemente, as moléculas de Rab·GTP interagem com **proteínas efetoras Rab** nas membranas para **fixar** a vesícula às membranas.

Etapa 6: As **v-SNARE se emparelham com t-SNARE cognatas** na membrana-alvo para **atracar** as vesículas e iniciar a fusão. Em geral, uma v-SNARE na vesícula emparelha-se com três t-SNARE na membrana aceptora, formando um **feixe** apertado de **quatro hélices**.

Etapa 7: Ocorre a **fusão** da vesícula com a membrana aceptora após o alinhamento estreito das v- e t-SNARES. Após a ocorrência da fusão da vesícula e liberação do conteúdo, o GTP é hidrolisado a GDP, e as moléculas de Rab·GDP são liberadas no citosol. Quando uma SNARE de uma membrana interage com uma SNARE de outra membrana, ligando as duas membranas, o complexo é designado como complexo *trans*-SNARE ou pino SNARE. As interações das SNARE na mesma membrana formam um complexo *cis*-SNARE. Para **dissociar o feixe de quatro hélices** entre as v- e t-SNARE, de modo que possam ser reutilizadas, são necessárias duas proteínas adicionais: uma **ATPase** (NSF) e uma **α-SNAP**. O NSF hidrolisa o ATP, e a energia liberada dissocia o feixe de quatro hélices, tornando as proteínas SNARE disponíveis para outro ciclo de fusão da membrana.

Etapa 8: Determinados componentes, como as proteínas Rab e SNARE, são **reciclados** para ciclos subsequentes de fusão de vesículas.

Durante o ciclo anteriormente descrito, as SNARE, as proteínas de fixação, a proteína Rab e outras proteínas **colaboram** para liberar uma vesícula e seu conteúdo no local apropriado.

As vesículas COPI, COPII e as revestidas por clatrina foram as mais estudadas

As seguintes considerações esclarecem e ampliam a seção anterior.

1. Conforme indicado na Tabela 46-9, existem **vários tipos diferentes de vesículas**. Outros tipos de vesículas ainda poderão ser descobertos. Nesta seção, são focalizadas principalmente as vesículas COPII, COPI e as revestidas por clatrina. Cada um desses tipos apresenta um complemento diferente de proteínas em seu revestimento. Os detalhes da montagem das vesículas COPI e revestidas por clatrina são ligeiramente diferentes daqueles descritos anteriormente. Por exemplo, a **Sar1** é a proteína envolvida na etapa 1 da formação das vesículas COPII, enquanto o **ARF** está envolvido na formação das vesículas COPI e das revestidas por clatrina. Entretanto, os princípios relacionados com a montagem desses diferentes tipos são, em geral, semelhantes.
2. No que concerne à **seleção** das moléculas de carga pelas vesículas, esse processo parece constituir primariamente uma **função das proteínas de revestimento** das vesículas. As **moléculas de carga,** por meio de seus sinais de seleção, podem interagir com as proteínas de revestimento **diretamente** ou por meio de **proteínas intermediárias** que se fixam às proteínas de revestimento; em seguida, são encerradas em suas vesículas apropriadas. Foram identificadas várias **sequências sinais** nas moléculas de carga (ver Tabela 46-1). Por exemplo, as sequências KDEL direcionam determinadas proteínas residentes do RE em fluxo retrógrado para o RE em vesículas COPI. As sequências diácidas (p. ex., Asp-X-Glu, X = qualquer aminoácido) e as sequências hidrofóbicas curtas nas proteínas de membrana estão envolvidas em interações com proteínas de revestimento das vesículas COPII.

   As proteínas nas regiões **apical** e **basolateral** das membranas plasmáticas das células epiteliais polarizadas podem ser transportadas para esses locais em **vesículas de transporte** por brotamento a partir da TGN. Diferentes proteínas Rab provavelmente direcionam algumas vesículas para as regiões apicais e outras para as regiões basolaterais. Em algumas células, as proteínas são inicialmente direcionadas para a membrana basolateral; em seguida, sofrem endocitose e são transportadas pela célula por **transcitose** até a região apical. Entretanto, outro mecanismo de seleção de proteínas para a região apical (ou, em alguns casos, para a região basolateral) envolve a **âncora de glicosilfosfatidilinositol** (**GPI**), descrita no Capítulo 47. Com frequência, essa estrutura está também presente nas **balsas lipídicas** (ver Capítulo 40).

   Nem todas as moléculas de carga podem ter um sinal de seleção. Algumas proteínas secretoras altamente abundantes são transportadas a vários destinos celulares em vesículas de transporte por **fluxo de massa**, isto é, entram nas vesículas de transporte nas mesmas concentrações em que ocorrem na organela. A extensão precisa do fluxo de massa não está claramente definida, embora pareça que as proteínas são, em sua maioria, ativamente selecionadas (concentradas) em vesículas de transporte, sendo o fluxo de massa usado por apenas um grupo selecionado de proteínas de carga.
3. Assim que as proteínas na via secretora alcançam o *cis*-Golgi, a partir do RE em vesículas, elas podem ser transportadas pelo AG até a rede *trans*-Golgi **em vesículas** ou por um processo denominado **maturação cisternal** ou, talvez em alguns casos, por **difusão** através de conexões intracisternais que foram observadas em alguns tipos de células. Um ponto de vista antigo era o de que o AG era, essencialmente, uma organela estática, possibilitando o fluxo vesicular de uma cisterna estática para outra. Entretanto, atualmente existem evidências que sustentam o conceito de que as cisternas movem-se e

transformam-se em outras (isto é, maturação cisternal). Nesse modelo, os elementos vesiculares do RE fundem-se entre si para ajudar a formar a *cis*-Golgi, que, por sua vez, pode mover-se para frente para se transformar nas cisternas mediais de Golgi, etc. As vesículas COPI transportam enzimas de Golgi (p. ex., glicosiltransferases) de volta das cisternas distais do AG para cisternas mais proximais (p. ex., *cis*).

4. As vesículas movem-se pelas células ao longo de **microtúbulos** ou ao longo de **filamentos de actina**.
5. O metabólito fúngico, a **brefeldina A**, **impede a ligação do GTP ao ARF** e, portanto, inibe a formação das vesículas COPI. Na sua presença, o aparelho de Golgi parece **colapsar no RE**. Isso pode ocorrer por meio da inibição do trocador de nucleotídeos de guanina envolvido na formação das vesículas COPI. Por isso, a brefeldina A demonstrou ser uma ferramenta útil para analisar alguns aspectos da estrutura e da função do aparelho de Golgi.
6. O **GTP-γ-S** (um análogo não hidrolisável do GTP, frequentemente empregado em pesquisas sobre a função do GTP nos processos bioquímicos) **bloqueia a desmontagem do revestimento** das vesículas revestidas, levando a um acúmulo de vesículas revestidas e facilitando, portanto, o seu estudo.
7. Conforme assinalado anteriormente, uma família de proteínas semelhantes à Ras, denominada **família das proteínas Rab**, é necessária em várias etapas do transporte intracelular de proteínas, bem como na secreção e endocitose reguladas. (As proteínas Ras estão envolvidas na sinalização celular por meio de receptores tirosina-quinase.) À semelhança das Ras, as proteínas Rab são **GTPases monoméricas pequenas**, que se fixam às superfícies citosólicas das membranas (por âncoras de lipídeo **geranilgeranil**). **Fixam-se** no **estado ligado ao GTP** à vesícula em brotamento e também estão presentes nas membranas aceptoras. As proteínas Rab interagem com as **proteínas efetoras Rab**, que desempenham vários papéis, como atuação na amarração e na fusão da membrana.
8. A fusão das **vesículas sinápticas** com a membrana plasmática dos **neurônios** envolve uma série de eventos semelhantes aos descritos anteriormente. Por exemplo, uma v-SNARE é denominada **sinaptobrevina**, e duas t-SNARE são designadas como **sintaxina** e **SNAP 25** (proteína associada ao sinaptossomo de 25 kDa). A **toxina botulínica B** é uma das toxinas mais letais conhecidas, que constitui a causa mais grave de intoxicação alimentar. Um dos componentes dessa toxina é uma **protease** que parece **clivar apenas a sinaptobrevina, inibindo**, assim, **a liberação da acetilcolina** na junção neuromuscular, o que possivelmente é fatal, dependendo da dose ingerida.
9. Embora o modelo descrito anteriormente seja aplicado às **vesículas não revestidas por clatrina**, parece provável que muitos dos eventos já descritos se apliquem, pelo menos em princípio, às vesículas revestidas por clatrina.
10. Algumas proteínas são ainda submetidas a **processamento adicional** por proteólise enquanto estão dentro das vesículas de transporte ou de secreção. Por exemplo, a **albumina** é sintetizada pelos hepatócitos sob a forma de **pré-pró-albumina** (ver Capítulo 50). Seu peptídeo sinal é removido, convertendo-a em **pró-albumina**. Por sua vez, a pró-albumina, enquanto está dentro das vesículas de transporte, é convertida em **albumina** pela ação da **furina** (**Figura 46-12**). Essa enzima cliva um hexapeptídeo da pró-albumina imediatamente C-terminal a um local de dois aminoácidos básicos (ArgArg). A albumina madura resultante é secretada no plasma. Hormônios como a **insulina** (ver Capítulo 41) são submetidos a clivagens proteolíticas semelhantes enquanto estão dentro das vesículas secretoras.

A MONTAGEM DAS MEMBRANAS É COMPLEXA

Existem muitas membranas celulares, cada uma delas com suas próprias características específicas. Não está disponível nenhum esquema satisfatório para descrever a montagem de qualquer uma dessas membranas. Nos parágrafos anteriores, foi discutido como várias proteínas são inicialmente inseridas na membrana do RE. Foi também descrito o transporte das proteínas dentro das vesículas, inclusive das proteínas de membrana, para várias partes da célula. Ainda é necessário considerar alguns aspectos gerais relativos à montagem das membranas.

A assimetria entre as proteínas e os lipídeos é mantida durante a montagem da membrana

As vesículas formadas a partir das membranas do RE e do aparelho de Golgi, seja naturalmente ou por desprendimento por homogeneização, exibem **assimetrias transversais** entre os lipídeos e as proteínas. Essas **assimetrias são mantidas** durante a fusão das vesículas de transporte com a membrana plasmática. Depois da fusão, o **interior** das vesículas transforma-se na **superfície externa da membrana plasmática,** enquanto a superfície citoplasmática das vesículas continua sendo o lado citoplasmático da membrana (**Figura 46-13**). Como a assimetria transversal das membranas já existe nas vesículas do RE bem antes de sua fusão com a membrana plasmática, um importante aspecto na compreensão do processo de montagem das membranas é saber como as proteínas integrais são inseridas na bicamada lipídica do RE. Esse problema foi analisado anteriormente neste capítulo.

Os **fosfolipídeos** constituem a principal classe de lipídeos nas membranas. As enzimas responsáveis pela síntese dos fosfolipídeos residem na superfície citoplasmática das cisternas do RE. À medida que os fosfolipídeos são sintetizados nesse local, eles provavelmente sofrem automontagem em camadas bimo-

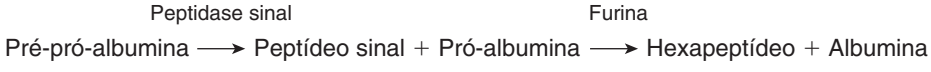


FIGURA 46-12 Clivagem da pré-pró-albumina em pró-albumina e desta em albumina. A furina cliva a pró-albumina na extremidade C-terminal de um dipeptídeo básico (ArgArg).

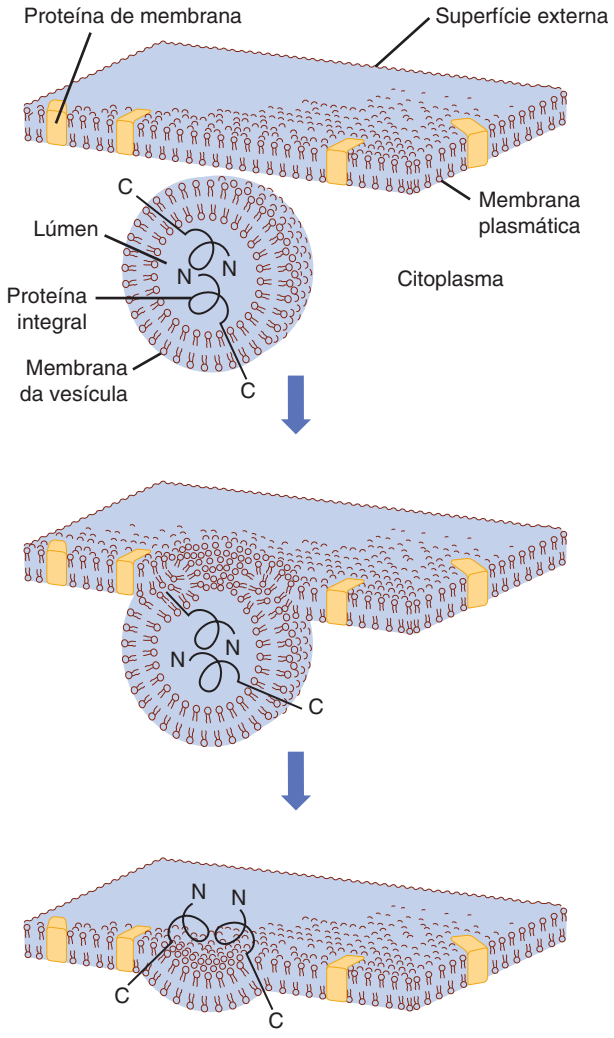


FIGURA 46-13 A fusão de uma vesícula com a membrana plasmática preserva a orientação das proteínas integrais inseridas na bicamada da vesícula. Inicialmente, a região aminoterminal da proteína está voltada para o lúmen, ou cavidade interna, dessa vesícula. Após a ocorrência da fusão, a região aminoterminal fica na superfície externa da membrana plasmática. Pode-se verificar que não houve inversão da orientação da proteína pela constatação de que a outra extremidade da molécula, a região carboxiterminal, está sempre imersa no citoplasma. O lúmen de uma vesícula e o exterior da célula são topologicamente equivalentes. (Redesenhada e modificada, com autorização, de Lodish HF, Rothman JE: The assembly of cell membranes. Sci Am [Jan] 1979;240:43.)

leculares termodinamicamente estáveis, ampliando, assim, a membrana e talvez promovendo o desprendimento das denominadas **vesículas lipídicas** da membrana. Foi sugerido que essas vesículas seguissem um trajeto para outros locais, doando seus lipídeos a outras membranas; entretanto, pouco se sabe a respeito desse processo. Conforme assinalado anteriormente, as proteínas citosólicas que captam os fosfolipídeos de uma membrana e os liberam em outra (ou seja, **proteínas de troca de fosfolipídeos**) já foram descritas; essas proteínas provavelmente desempenham um papel, contribuindo para a composição lipídica específica de várias membranas.

Convém assinalar que as **composições lipídicas** do RE, do aparelho de Golgi e da membrana plasmática diferem: estas últimas duas membranas contêm **quantidades maiores de colesterol**, **esfingomielina e glicoesfingolipídeos** e **menores quantidades de fosfolipídeos** do que o RE. Os esfingolipídeos agrupam-se mais densamente nas membranas do que os fosfoglicerídeos. Essas diferenças afetam as estruturas e as funções das membranas. Por exemplo, a **espessura da bicamada** do AG e da MP é maior que a do RE, o que influencia os tipos de proteínas transmembrana específicas encontrados nessas organelas. Além disso, acredita-se que as **balsas lipídicas** (ver Capítulo 40) sejam formadas no AG.

Os lipídeos e as proteínas sofrem renovação em taxas distintas em diferentes membranas

Foi constatado que as meias-vidas dos lipídeos das membranas do RE do fígado de rato são, em geral, mais curtas que as de suas proteínas, de modo que as **taxas de renovação dos lipídeos e das proteínas são independentes**. Com efeito, foi constatado que diferentes lipídeos apresentam meias-vidas diferentes. Além disso, as meias-vidas das proteínas dessas membranas variam amplamente, visto que algumas exibem meias-vidas curtas (horas) e outras, longas (dias). Portanto, os lipídeos e as proteínas individuais das membranas do RE parecem ser inseridos de modo relativamente independente, o que também ocorre em muitas outras membranas.

Por conseguinte, a biogênese das membranas é um processo complexo sobre o qual ainda há muito que aprender. Uma indicação da complexidade envolvida consiste no número de **modificações pós-tradução** que as proteínas de membrana podem sofrer antes de atingir o seu estado maduro. Essas modificações incluem formação de dissulfetos, proteólise, montagem em multímeros, glicosilação, acréscimo de uma âncora de glicofosfatidilinositol (GPI), sulfatação da tirosina ou de frações de carboidratos, fosforilação, acilação e prenilação – uma lista que não é completa. Entretanto, foram efetuados avanços significativos; a **Tabela 46-11** fornece um resumo de algumas das principais características da montagem das membranas que foram elucidadas até a presente data.

TABELA 46-11 Algumas das principais características da montagem das membranas

• Os lipídeos e as proteínas são inseridos independentemente nas membranas.
• Os lipídeos e as proteínas individuais das membranas sofrem renovação independente e em taxas diferentes.
• As sequências topogênicas [p. ex., sinal (aminoterminal ou interno) e parada-transferência] são importantes na determinação da inserção e disposição das proteínas nas membranas.
• As proteínas de membrana dentro das vesículas de transporte brotam a partir do retículo endoplasmático em seu trajeto até o aparelho de Golgi; a seleção final de muitas proteínas de membrana ocorre na rede *trans*-Golgi.
• Sequências específicas de seleção orientam as proteínas para determinadas organelas, como lisossomos, peroxissomos e mitocôndrias.

Vários distúrbios resultam de mutações dos genes que codificam as proteínas envolvidas no transporte intracelular

Alguns distúrbios que refletem anormalidades da função dos **peroxissomos** e da síntese de proteínas no **RE**, bem como da síntese de **proteínas lisossomais,** foram relacionados anteriormente neste capítulo (ver as Tabelas 46-3 e 46-8, respectivamente). Foram relatadas muitas outras mutações que afetam o dobramento das proteínas e o seu transporte intracelular para várias organelas, mas que não são discutidas aqui [p. ex., doença de Alzheimer (ver Capítulo 57) e doença de Huntington]. A elucidação das causas desses vários **distúrbios conformacionais** contribuiu significativamente para a compreensão da **patologia molecular.** O termo "**doenças por deficiências na proteostase**" também tem sido aplicado a doenças causadas por dobramento incorreto das proteínas. A proteostase é uma palavra composta, derivada de homeostase proteica. A proteostase normal resulta de um equilíbrio de numerosos fatores, como síntese, dobramento, tráfego, agregação e degradação normal. Se qualquer um desses processos for afetado (p. ex., por mutação, envelhecimento, estresse ou lesão celular), pode ocorrer uma variedade de distúrbios, dependendo das proteínas específicas envolvidas.

Além da possibilidade de **terapia gênica**, espera-se que as tentativas de restaurar pelo menos um grau de dobramento normal das proteínas dobradas de modo inapropriado pela **administração**, **ao indivíduo acometido, de moléculas pequenas** que interagem especificamente com essas proteínas irão resultar em benefício terapêutico. Esta é uma área de pesquisa muito ativa.

RESUMO

- Muitas proteínas são direcionadas a seus destinos por sequências sinais. Uma decisão seletiva importante é feita quando as proteínas são distribuídas entre os polirribossomos citosólicos e os polirribossomos ligados à membrana, em virtude da ausência ou presença de um peptídeo sinal N-terminal.
- São descritas as vias de importação das proteínas nas mitocôndrias, nos núcleos, nos peroxissomos e no retículo endoplasmático.
- Numerosas proteínas sintetizadas nos polirribossomos ligados à membrana são levadas ao aparelho de Golgi e à membrana plasmática em vesículas de transporte.
- Ocorrem muitas reações de glicosilação nos compartimentos do aparelho de Golgi, e as proteínas são ainda selecionadas na rede *trans*-Golgi.
- São descritos o papel das proteínas chaperonas no dobramento das proteínas e a UPR.
- A ERAD é descrita de modo sucinto, e o papel essencial da ubiquitina na degradação das proteínas é apresentado.
- O modelo que descreve o brotamento e a fusão das vesículas de transporte a uma membrana-alvo é resumido.
- Algumas proteínas (p. ex., precursores da albumina e insulina) são submetidas à proteólise dentro das vesículas de transporte, produzindo as proteínas maduras.
- As GTPases pequenas (p. ex., Ran, Rab) e os GEF desempenham papéis essenciais em muitos aspectos do tráfego intracelular.
- O processo complexo de montagem da membrana é discutido de modo sucinto. A assimetria dos lipídeos e das proteínas é mantida durante a montagem da membrana.
- Foi demonstrado que muitos distúrbios são causados por mutações de genes ou por outros fatores que afetam o dobramento de várias proteínas. Essas condições foram denominadas doenças conformacionais ou, alternativamente, doenças por deficiência na proteostase. Além da terapia gênica, o desenvolvimento de moléculas pequenas que interagem com proteínas incorretamente dobradas e que ajudam a restaurar pelo menos parte de sua função constitui uma importante área de pesquisa.

REFERÊNCIAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al: *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed. Garland Science, 2008. (An excellent textbook of cell biology, with comprehensive coverage of trafficking and sorting).

Alder NN, Johnson AE: Cotranslational membrane protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. J Biol Chem 2004;279:22787.

Bonifacino JS, Glick BS: The mechanisms of vesicle budding and fusion. Cell 2004;116:153.

Cooper GM, Hausman RE: *The Cell: A Molecular Approach*. Sinauer Associates, Inc. 2009. (An excellent textbook of cell biology, with comprehensive coverage of trafficking and sorting).

Lai E, Teodoro T, Volchuk A: Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. Physiology 2007;22:193.

Lodish H, Berk A, Krieger M, et al: *Molecular Cell Biology*, 6th ed. WH Freeman & Co., 2008. (An excellent textbook of cell biology, with comprehensive coverage of trafficking and sorting).

Neupert W, Herrmann JM: Translocation of proteins into mitiochondria. Annu Rev Biochem 2007;76:723.

Platta HW, Erdmann R: The peroxisomal protein import machinery. FEBS Lett 2007;581;2811.

Pollard TD, Earnshaw WC: *Cell Biology*, 2nd ed. WB Saunders, 2008. (An excellent textbook of cell biology, with comprehensive coverage of trafficking and sorting).

Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, et al: Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. Annu Rev Biochem 2009;78:959.

Romisch K: Endoplasmic-reticulum–associated degradation. Annu Rev Cell Dev Biol 2005;21:435.

Stewart M: Molecular mechanisms of the nuclear protein import cycle. Nature Rev Mol Cell Biol 2007;8:195.

CAPÍTULO

47

Glicoproteínas

Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Obter uma compreensão geral da importância da glicobiologia e glicômica e, em particular, das glicoproteínas tanto na saúde quanto na doença.
- Conhecer os principais açúcares encontrados nas glicoproteínas.
- Identificar as várias classes principais de glicoproteínas (*N*-ligadas, *O*-ligadas e GPI-ligadas).
- Compreender as principais características das vias de biossíntese e de degradação das glicoproteínas *O*-ligadas e *N*-ligadas.
- Inferir a importância dos produtos finais de glicação avançada como causa de lesão tecidual no diabetes melito.
- Ser capaz de indicar a participação das glicoproteínas na inflamação e em numerosas condições, incluindo doença da célula I, distúrbios congênitos da glicação, hemoglobinúria paroxística noturna e câncer.
- Estar familiarizado com o conceito de que muitos microrganismos, como o vírus *influenza*, fixam-se às superfícies das células por meio de cadeias de açúcar.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A **glicobiologia** é o estudo das funções que os açúcares desempenham na saúde e na doença. O **glicoma** refere-se ao complemento total de açúcares de um organismo, seja na forma livre ou presentes em moléculas mais complexas. A **glicômica**, um termo análogo à genômica e à proteômica, refere-se ao estudo abrangente dos glicomas, incluindo os aspectos genéticos, fisiológicos, patológicos, entre outros.

As glicoproteínas constituem uma importante classe de moléculas pertencentes ao glicoma. Essas proteínas contêm cadeias oligossacarídicas (glicanos) ligadas de modo covalente às suas estruturas polipeptídicas. Foi estimado que aproximadamente 50% das proteínas das células eucarióticas apresentam açúcares ligados, de modo que a glicosilação (fixação enzimática de açúcares) constitui a modificação pós-tradução mais comum das proteínas. Pode ocorrer também fixação não enzimática dos açúcares às proteínas, processo conhecido como glicação. Esse processo pode ter consequências patológicas graves (p. ex., no diabetes melito inadequadamente controlado). As glicoproteínas constituem uma classe de glicoconjugados ou carboidratos complexos – termos equivalentes empregados para descrever moléculas que contêm uma ou mais cadeias de carboidratos ligadas de modo covalente às proteínas (para formar glicoproteínas ou proteoglicanos) ou aos lipídeos (para formar glicolipídeos). (Os proteoglicanos são discutidos no Capítulo 48, e os glicolipídeos, no Capítulo 15.) Quase todas as proteínas plasmáticas dos seres humanos – com a notável exceção da albumina – são glicoproteínas. Muitas proteínas das membranas celulares (Capítulo 40) contêm quantidades expressivas de carboidratos. Algumas das substâncias dos grupos sanguíneos são glicoproteínas, enquanto outras são glicoesfingolipídeos. Alguns hormônios (p. ex., gonadotropina coriônica) são glicoproteínas. Um importante problema no câncer é a ocorrência de metástases, fenômeno pelo qual as células neoplásicas deixam o seu tecido de origem (p. ex., a mama), migram pela corrente sanguínea até algum local distante do corpo (p. ex., o cérebro), onde proliferam de maneira descontrolada, com resultados catastróficos para o indivíduo acometido. Muitos pesquisadores na área da oncologia acreditam que a ocorrência de alterações nas estruturas das glicoproteínas e de outros glicoconjugados na superfície das células neoplásicas seja importante na ocorrência das metástases.

AS GLICOPROTEÍNAS ESTÃO LARGAMENTE DISTRIBUÍDAS E DESEMPENHAM NUMEROSAS FUNÇÕES

As glicoproteínas ocorrem na maioria dos organismos, desde as bactérias até os seres humanos. Muitos vírus também contêm glicoproteínas, algumas das quais foram amplamente investigadas, em parte porque, com frequência, desempenham papéis essenciais na fixação dos vírus às células (p. ex., HIV-1 e vírus *influenza* A). Numerosas proteínas com funções diversas são glicoproteínas (**Tabela 47-1**), e o seu teor de carboidratos varia de 1 a mais de 85% do seu peso.

Muitos estudos foram conduzidos na tentativa de definir os papéis precisos que as cadeias de oligossacarídeos desempenham nas funções das glicoproteínas. A **Tabela 47-2** fornece um resumo dos resultados desses estudos. Algumas das funções listadas estão firmemente estabelecidas, enquanto outras ainda se encontram em fase de pesquisa.

AS CADEIAS OLIGOSSACARÍDICAS CODIFICAM INFORMAÇÕES BIOLÓGICAS

Os açúcares podem formar um número enorme de ligações glicosídicas. Por exemplo, três hexoses diferentes podem ligar-se entre si para formar mais de 1.000 trissacarídeos diferentes. As conformações dos açúcares nas cadeias oligossacarídicas variam, dependendo de suas ligações e das proximidades de outras moléculas com as quais os oligossacarídeos podem interagir. Atualmente, já está bem estabelecido que determinadas cadeias oligossacarídicas codificam **informações biológicas**, e que essa característica depende de seus açúcares constituintes, de suas sequências e de suas ligações. Por exemplo, os resíduos de manose-6-fosfato direcionam enzimas lisossomais recém-sintetizadas para essas organelas (ver adiante). A informação biológica contida nos açúcares é expressa por meio de interações entre açúcares específicos, tanto na forma livre quanto em glicoconjugados, proteínas (como as lectinas, ver adiante) e outras moléculas. Essas interações levam a alterações da atividade celular. Por conseguinte, decifrar o denominado **código dos açúcares da vida** (um dos principais objetivos da glicômica) implica elucidar todas as interações nas quais participam os açúcares e as moléculas que contêm açúcares, bem como as consequências dessas interações no comportamento celular. Essa tarefa não é fácil, tendo em vista a diversidade dos glicanos existentes nas células.

EXISTEM TÉCNICAS PARA A DETECÇÃO, A PURIFICAÇÃO, A ANÁLISE ESTRUTURAL E A SÍNTESE DAS GLICOPROTEÍNAS

A **Tabela 47-3** fornece uma lista de diversos métodos empregados na detecção, na purificação e na análise estrutural das glicoproteínas. Os métodos convencionais utilizados para purificar as proteínas e as enzimas também são aplicáveis à purificação das glicoproteínas. Após a purificação de uma glicoproteína, o uso da **espectrometria de massa** e da **espectroscopia de ressonância magnética** (**RM**) muitas vezes pode identificar as estruturas de suas cadeias de glicanos. A análise das glicoproteínas pode ser complicada pelo fato

TABELA 47-1 Algumas funções desempenhadas pelas glicoproteínas

Função	Glicoproteínas
Moléculas estruturais	Colágenos
Agentes lubrificantes e protetores	Mucinas
Moléculas de transporte	Transferrina, ceruloplasmina
Moléculas imunológicas	Imunoglobulinas, antígenos de histocompatibilidade
Hormônios	Gonadotropina coriônica, hormônio tireoestimulante (TSH)
Enzimas	Várias, por exemplo, fosfatase alcalina
Sítio de reconhecimento e fixação celular	Várias proteínas envolvidas nas interações entre células (p. ex., espermatozoide e ovócito), entre vírus e células, bactérias e células e hormônios e células
Anticongelante	Algumas proteínas plasmáticas dos peixes de águas frias
Interações com carboidratos específicos	Lectinas, selectinas (lectinas de adesão celular), anticorpos
Receptores	Várias proteínas envolvidas na ação dos hormônios e dos fármacos
Afetam o dobramento de determinadas proteínas	Calnexina, calreticulina
Regulação do desenvolvimento	Notch e seus análogos, proteínas essenciais no desenvolvimento
Hemostasia (e trombose)	Glicoproteínas específicas nas membranas superficiais das plaquetas

TABELA 47-2 Algumas funções das cadeias oligossacarídicas das glicoproteínas

- Modular as propriedades físico-químicas, como, por exemplo, solubilidade, viscosidade, carga, conformação, desnaturação e sítios de ligação para várias moléculas, bactérias, vírus e alguns parasitas.
- Proteger contra a proteólise, dentro e fora da célula.
- Influenciar o processamento proteolítico das proteínas precursoras em produtos menores.
- Participar da atividade biológica, como, por exemplo, da gonadotropina coriônica humana (hCG).
- Afetar a inserção nas membranas, a migração intracelular e a seleção e secreção.
- Atuar no desenvolvimento e diferenciação dos embriões.
- Podem afetar locais de metástases selecionados por células neoplásicas.

Fonte: Adaptada, com autorização, de Schachter H:Biosynthetic controls that determine the branching and heterogeneity of protein-bound oligosaccharides. Biochem Cell Biol 1986;64:163.

TABELA 47-3 Alguns métodos importantes utilizados para o estudo das glicoproteínas

Método	Uso
Reagente ácido periódico de Schiff	Detectar as glicoproteínas como bandas rosadas após separação eletroforética.
Incubação de células em cultura com um açúcar radioativo	Possibilitar a detecção de glicoproteínas na forma de bandas radioativas após separação por eletroforese.
Tratamento com endoglicosidase ou exoglicosidase ou fosfolipases apropriadas	As mudanças resultantes na migração eletroforética ajudam a diferenciar as proteínas com ligações de *N*-glicano, *O*-glicano ou GPI, bem como os *N*-glicanos complexos e ricos em manose.
Cromatografia em coluna de sefarose-lectina	Purificar as glicoproteínas ou glicopeptídeos que se ligam à lectina específica utilizada.
Análise da composição após hidrólise ácida	Identificar os açúcares contidos na glicoproteína e sua estequiometria.
Espectrometria de massa	Fornecer informações, como massa molecular, composição, sequência e, algumas vezes, ramificação de uma cadeia de glicano.
Espectroscopia RM	Identificar açúcares específicos, suas sequências, ligações e natureza anomérica das ligações glicosídicas.
Análise da metilação (ligação)	Determinar as ligações entre os açúcares.
Sequenciamento dos aminoácidos ou do cDNA	Determinar a sequência dos aminoácidos.

de que elas frequentemente ocorrem como **glicoformas**; trata-se de proteínas com sequências idênticas de aminoácidos, porém com composições oligossacarídicas ligeiramente diferentes. Embora os detalhes de ligação não sejam ressaltados neste capítulo, é importante reconhecer que as naturezas precisas das ligações entre os açúcares das glicoproteínas são de importância fundamental na determinação das estruturas e das funções dessas moléculas.

Foram também efetuados avanços impressionantes na **química sintética**, possibilitando a síntese de glicanos complexos, que podem ser testados quanto à atividade biológica e farmacológica. Além disso, foram desenvolvidos métodos que utilizam microrganismos simples, como as leveduras, para secretar glicoproteínas humanas de valor terapêutico (p. ex., eritropoietina) no meio circundante.

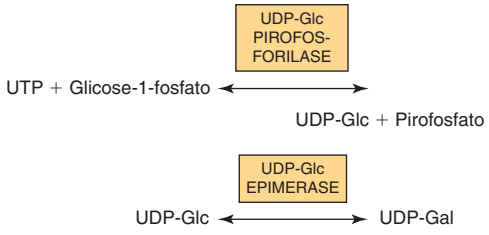
OITO AÇÚCARES PREDOMINAM NAS GLICOPROTEÍNAS HUMANAS

Na natureza, são encontrados cerca de 200 monossacarídeos; entretanto, apenas oito ocorrem comumente nas cadeias oligossacarídicas das glicoproteínas (**Tabela 47-4**). Esses açúcares foram descritos, em sua maior parte, no Capítulo 14. O ácido *N*-acetilneuramínico (NeuAc) é geralmente encontrado nas terminações das cadeias oligossacarídicas, ligado à galactose (Gal) subterminal ou a resíduos de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc). Os outros açúcares citados são geralmente encontrados em posições mais internas. O **sulfato** está frequentemente presente nas glicoproteínas, geralmente ligado à Gal, GalNAc ou GlcNAc.

OS AÇÚCARES NUCLEOTÍDICOS ATUAM COMO DOADORES DE AÇÚCAR EM MUITAS REAÇÕES DE BIOSSÍNTESE

É importante compreender que, na maioria das reações de biossíntese, não é o açúcar livre ou o açúcar fosforilado que está envolvido nessas reações, porém o **açúcar nucleotídico** correspondente. O primeiro açúcar nucleotídico descrito foi a uridina difosfato glicose (UDP-Glc); a sua estrutura está ilustrada na Figura 19-2. Os açúcares nucleotídicos comuns envolvidos na biossíntese das glicoproteínas estão relacionados na Tabela 47-4; as razões pelas quais algumas contêm UDP e outras guanosina difosfato (GDP) ou citidina monofosfato (CMP) ainda não foram esclarecidas. Muitas das reações de glicosilação que estão envolvidas na biossíntese das glicoproteínas utilizam esses compostos (ver adiante). A **natureza anídrica** da ligação entre o grupo fosfato e os açúcares é de alta energia, do tipo de alto potencial de transferência de grupos (Capítulo 11). Portanto, os açúcares desses compostos são "**ativados**" e podem ser transferidos para aceptores apropriados, contanto que existam transferases também apropriadas.

Os açúcares nucleotídicos são sintetizados, em sua maior parte, no citosol, geralmente a partir de reações que envolvem o nucleosídeo trifosfato correspondente. Os CMP-ácidos siálicos são formados no núcleo. A síntese da uridina difosfato galactose (UDP-Gal) requer as duas reações seguintes nos tecidos dos mamíferos:



Como muitas reações de glicosilação ocorrem dentro do lúmen do aparelho de Golgi, são necessários **sistemas carreadores** (permeases, transportadores) para o transporte dos açúcares nucleotídicos através da membrana de Golgi. Foram descritos sistemas que transportam a UDP-Gal, a GDP-Man e o CMP-NeuAc para dentro das cisternas do aparelho de Golgi. Trata-se de sistemas **antiporte**, isto é, o influxo de uma molécula de açúcar nucleotídico é equilibrado pelo efluxo de uma molécula do nucleotídeo correspondente (p. ex., UMP, GMP ou CMP) formado a partir dos açúcares nucleotídicos. Esse mecanismo assegura uma concentração adequada de cada açúcar nucleotídico dentro do aparelho de Golgi. O UMP é formado a partir da UDP-Gal no processo anterior da seguinte maneira:

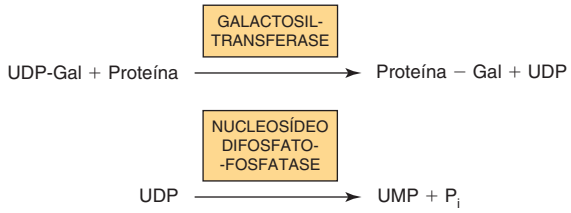


TABELA 47-4 Os principais açúcares encontrados nas glicoproteínas humanas[1]

Açúcar	Tipo	Abreviatura	Açúcar nucleotídico	Comentários
Galactose	Hexose	Gal	UDP-Gal	Frequentemente encontrada em posição subterminal ao NeuAc nas glicoproteínas *N*-ligadas. Está também presente no trissacarídeo central dos proteoglicanos.
Glicose	Hexose	Glc	UDP-Glc	Presente durante a biossíntese das glicoproteínas *N*-ligadas, porém não é habitualmente encontrada nas glicoproteínas maduras. Presente em alguns fatores da coagulação.
Manose	Hexose	Man	GDP-Man	Açúcar comum nas glicoproteínas *N*-ligadas.
Ácido *N*-Acetilneuramínico	Ácido siálico (nove átomos de C)	NeuAc	CMP-NeuAc	É, frequentemente, o açúcar terminal nas glicoproteínas *N*-e *O*-ligadas. Outros tipos de ácido siálico também são encontrados, porém o NeuAc é a principal espécie existente nos seres humanos. Os grupos acetil também podem ocorrer em espécies como *O*-acetil e *N*-acetil.
Fucose	Desoxi-hexose	Fuc	GDP-Fuc	Pode ter localização externa nas glicoproteínas tanto *N*-ligadas quanto *O*-ligadas, ou uma localização interna, ligada ao resíduo de GlcNAc fixado a Asn na espécie *N*-ligada. Pode ocorrer também internamente, ligada ao grupo OH da Ser (p. ex., no t-PA e em alguns fatores da coagulação).
N-Acetilgalatosamina	Amino-hexose	GalNAc	UDP-GalNAc	Presente nas glicoproteínas tanto *N*-ligadas quanto *O*-ligadas.
N-Acetilglicosamina	Amino-hexose	GlcNAc	UDP-GlcNAc	O açúcar fixado à cadeia polipeptídica por meio da Asn nas glicoproteínas *N*-ligadas; encontrada também em outros locais nos oligossacarídeos dessas proteínas. Muitas proteínas nucleares apresentam a GlcNAc fixada ao grupo OH da Ser ou Thr como único açúcar.
Xilose	Pentose	Xyl	UDP-Xyl	A Xyl está fixada ao grupo OH da Ser em muitos proteoglicanos; também está ligada a dois resíduos de Gal, formando um trissacarídeo ligado. A Xyl ainda é encontrada no t-PA e em alguns fatores da coagulação.

[1]As estruturas das glicoproteínas estão ilustradas no Capítulo 14.

AS EXOGLICOSIDASES E AS ENDOGLICOSIDASES FACILITAM O ESTUDO DAS GLICOPROTEÍNAS

Várias **glicosidases** com especificidade definida demonstraram ser úteis na análise dos aspectos estruturais e funcionais das glicoproteínas (**Tabela 47-5**). Essas enzimas atuam nas posições externas (exoglicosidases) ou internas (endoglicosidases) das cadeias oligossacarídicas. São exemplos de exoglicosidases as **neuraminidases** e as **galactosidases**; sua utilização sequencial remove os resíduos NeuAc terminal e Gal subterminal da maioria das glicoproteínas. As **endoglicosidases F** e **H** são exemplos da segunda classe; essas enzimas clivam as cadeias oligossacarídicas em resíduos específicos de GlcNAc situados próximo da estrutura polipeptídica (i.e., em locais internos; Figura 47-5) e, portanto, são úteis para remover grandes cadeias oligossacarídicas para efetuar análises estruturais. Uma glicoproteína pode ser tratada com uma ou mais das glicosidases citadas anteriormente para analisar os efeitos da remoção de açúcares específicos sobre o seu comportamento biológico.

TABELA 47-5 Algumas glicosidases utilizadas no estudo da estrutura e da função das glicoproteínas[1]

Enzimas	Tipo
Neuraminidases	Exoglicosidase
Galactosidases	Exo- ou endoglicosidase
Endoglicosidase F	Endoglicosidase
Endoglicosidase H	Endoglicosidase

[1]As enzimas são obtidas de uma variedade de fontes e, com frequência, são específicas para determinados tipos de ligações glicosídicas, bem como para suas naturezas anoméricas. Os locais de ação das endoglicosidases F e H estão ilustrados na Figura 47-5. A endoglicosidase F atua em oligossacarídeos ricos em manoses e em oligossacarídeos complexos, enquanto a endoglicosidase H atua nos primeiros.

O RECEPTOR DE ASSIALOGLICOPROTEÍNAS DOS MAMÍFEROS ESTÁ ENVOLVIDO NA DEPURAÇÃO DE DETERMINADAS GLICOPROTEÍNAS DO PLASMA PELOS HEPATÓCITOS

Experimentos realizados por Ashwell e colaboradores, no início da década de 1970, desempenharam um importante papel na focalização da atenção no significado funcional das cadeias oligossacarídicas das glicoproteínas. Esses pesquisadores trataram a ceruloplasmina (uma proteína plasmática; ver Capítulo 50) do coelho com neuraminidase *in vitro*. Esse procedimento possibilitou a exposição de resíduos de Gal subterminais, que normalmente ficam ocultos pelos resíduos de NeuAc terminais. Foi constatado

que a ceruloplasmina radioativa tratada com neuraminidase desaparece rapidamente da circulação, em contraste com a depuração lenta da proteína não tratada. De modo significativo, quando os resíduos de Gal expostos ao tratamento com neuraminidase foram removidos por tratamento com uma galactosidase, a taxa de depuração da proteína retornou ao normal. Estudos subsequentes demonstraram que as células hepáticas contêm um **receptor de assialoglicoproteínas dos mamíferos,** que reconhece a fração Gal de muitas proteínas plasmáticas dessialiladas, resultando em sua endocitose. Esse estudo indicou que um açúcar individual, como a Gal, poderia desempenhar um importante papel na determinação de, pelo menos, uma das propriedades biológicas (ou seja, tempo de permanência na circulação) de certas glicoproteínas. Esse achado reforçou acentuadamente o conceito de que as cadeias oligossacarídicas poderiam conter informações biológicas.

AS LECTINAS PODEM SER UTILIZADAS PARA PURIFICAR AS GLICOPROTEÍNAS E INVESTIGAR SUAS FUNÇÕES

As lectinas são **proteínas de ligação dos carboidratos** que aglutinam as células ou precipitam glicoconjugados; algumas dessas lectinas são glicoproteínas. As imunoglobulinas que reagem com açúcares não são consideradas lectinas. As lectinas contêm pelo menos dois sítios de ligação de açúcar; as proteínas com um único sítio de ligação de açúcar não aglutinam as células nem precipitam glicoconjugados. A especificidade de uma lectina é, com frequência, definida pelos açúcares mais apropriados para inibir a sua capacidade de provocar aglutinação ou precipitação. As enzimas, as toxinas e as proteínas de transporte podem ser classificadas como lectinas quando se ligam a carboidratos. As lectinas foram descobertas pela primeira vez em vegetais e micróbios, porém, hoje, são conhecidas muitas lectinas de origem animal. O receptor de assialoglicoproteínas dos mamíferos, descrito anteriormente, é um exemplo importante de lectina animal. A **Tabela 47-6** fornece uma relação de algumas lectinas importantes. Grande parte das pesquisas atuais está concentrada nas funções das várias lectinas animais nos mecanismos de ação das glicoproteínas, alguns dos quais são discutidos adiante (p. ex., com relação às lectinas).

Numerosas lectinas foram purificadas e estão disponíveis no comércio; a **Tabela 47-7** relaciona três lectinas vegetais que têm sido amplamente usadas em experimentos. Entre diversas aplicações, as lectinas têm sido empregadas para purificar glicoproteínas específicas, como ferramentas para investigar os perfis glicoproteicos das superfícies celulares e como reagentes para gerar células mutantes com deficiência de determinadas enzimas envolvidas na biossíntese das cadeias oligossacarídicas.

EXISTEM TRÊS CLASSES PRINCIPAIS DE GLICOPROTEÍNAS

Com base na natureza da ligação entre suas cadeias polipeptídicas e oligossacarídicas, as glicoproteínas podem ser divididas em três classes principais (**Figura 47-1**). (1) As glicoproteínas que contêm uma **ligação *O*-glicosídica** (ou seja, *O*-ligadas), que envolve a cadeia lateral com hidroxila da serina ou da treonina e um açúcar, como a *N*-acetilgalactosamina (GalNAc-Ser[Thr]); (2) as glicoproteínas que contêm uma **ligação *N*-glicosídica** (ou seja, *N*-ligadas), envolvendo o nitrogênio amida da asparagina e a *N*-acetilglicosamina (GlcNAc-Asn); e (3) as glicoproteínas ligadas ao aminoácido carboxiterminal de uma proteína por meio de uma fração fosforil-etanolamina acoplada a um oligossacarídeo (glicano), que, por sua vez, está ligado ao fosfatidilinositol (PI) pela glicosamina. Esta última classe é designada como glicoproteínas **ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol** (**GPI-ancoradas** ou **GPI-ligadas**). Entre outras funções, as glicoproteínas dessa classe estão envolvidas no direcionamento de certas glicoproteínas para as áreas apicais ou basolaterais da membrana plasmática (MP) de algumas células epiteliais polarizadas (ver Capítulo 40 e adiante). Existem também outras classes menores de glicoproteínas.

O número de cadeias oligossacarídicas ligadas a uma proteína pode variar de uma até 30 ou mais, variando as cadeias de açúcares de um ou dois resíduos de comprimento até estruturas muito maiores. Muitas proteínas contêm mais de um tipo de cadeia de açúcar; por exemplo, a **glicoforina**, uma importante glicoproteína da membrana eritrocitária (Capítulo 52), contém oligossacarídeos *O*-ligados e *N*-ligados.

TABELA 47-6 Algumas lectinas importantes

Lectinas	Exemplos ou comentários
Lectinas de legumes	Concanavalina A, lectina da ervilha.
Aglutinina do germe de trigo	Amplamente usada em estudo das superfícies das células normais e células neoplásicas.
Ricina	Glicoproteína citotóxica derivada das sementes da mamona.
Toxinas bacterianas	Enterotoxina termolábil de *E. coli* e da toxina do cólera.
Hemaglutinina do vírus *influenza*	Responsável pela fixação do vírus à célula hospedeira e fusão da membrana.
Lectinas tipo C	Caracterizadas por um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) dependente de Ca^{2+}; incluem o receptor de assialoglicoproteínas dos mamíferos, as selectinas e a proteína de ligação da manose.
Lectinas tipo S	Lectinas animais de ligação da β-galactosidase, que desempenham funções nas interações entre células e entre célula e matriz.
Lectinas tipo P	Receptor de manose-6-P.
Lectinas tipo I	Membros da superfamília das imunoglobulinas, como, por exemplo, sialoadesina mediando a adesão dos macrófagos a várias células.

TABELA 47-7 Três lectinas vegetais e os açúcares com os quais interagem[1]

Lectina	Abreviatura	Açúcares
Concavalina A	ConA	Man e Glc
Lectina da soja		Gal e GalNAc
Aglutinina do germe de trigo	WGA	Glc e NeuAc

[1]Na maioria dos casos, as lectinas exibem especificidade pela natureza anomérica da ligação glicosídica (α ou β), o que não está indicado na Tabela.

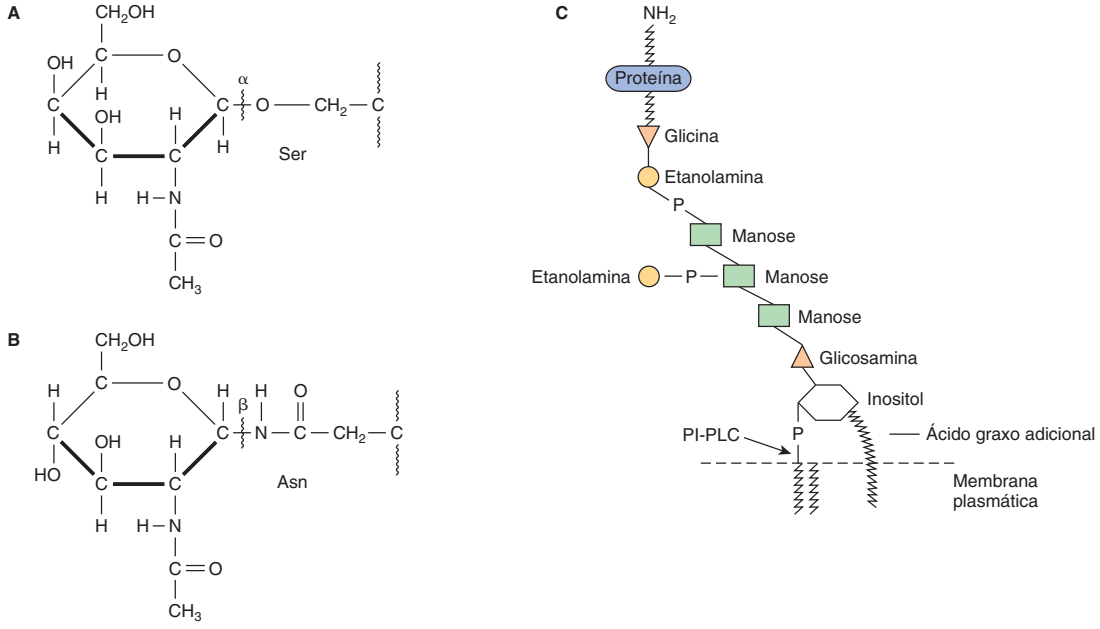


FIGURA 47-1 Ilustrações de (A) uma *O*-ligação (*N*-acetilgalactosamina à serina), (B) uma *N*-ligação (*N*-acetilglicosamina à asparagina) e (C) uma ligação glicosilfosfatidilinositol (GPI). A estrutura do GPI mostrada é aquela que liga a acetilcolinesterase à membrana plasmática dos eritrócitos humanos. O aminoácido carboxiterminal é a glicina unida em ligação amídica por meio de seu grupo COOH ao grupo NH_2 da fosforiletanolamina, que, por sua vez, está acoplada a um resíduo de manose. O glicano central contém três resíduos de manose e um de glicosamina. A glicosamina está ligada ao inositol, que está fixado ao ácido fosfatídico. O local de ação da PI-fosfolipase C (PI-PLC) está indicado. A estrutura do glicano central é descrita no texto. Esse GPI particular contém um ácido graxo extra ligado ao inositol, bem como uma fração adicional de fosforiletanolamina ligada no meio dos três resíduos de manose. As variações observadas entre as diferentes estruturas de GPI incluem a identidade do aminoácido carboxiterminal, as moléculas ligadas aos resíduos de manose e a natureza precisa da fração lipídica.

AS GLICOPROTEÍNAS CONTÊM VÁRIOS TIPOS DE LIGAÇÕES *O*-GLICOSÍDICAS

Pelo menos quatro subclasses de ligações *O*-glicosídicas são encontradas nas glicoproteínas humanas. (1) A ligação **GalNAc--Ser(Thr)** mostrada na Figura 47-1 é a ligação predominante. A **Figura 47-2** ilustra duas cadeias oligossacarídicas típicas encontradas em membros dessa subclasse. Em geral, um resíduo de Gal ou de NeuAc está ligado ao GalNAc, porém são encontradas muitas variações nas composições dos açúcares e nos comprimentos dessas cadeias oligossacarídicas. Esse tipo de ligação ocorre nas **mucinas** (ver adiante). (2) Os **proteoglicanos** contêm um trissacarídeo **Gal-Gal-Xyl-Ser** (o denominado trissacarídeo de ligação). (3) Os **colágenos** apresentam uma ligação **Gal-Hidroxilisina (Hyl)**. (As subclasses [2] e [3] são discutidas com mais detalhes no Capítulo 48.) (4) Muitas **proteínas nucleares** (p. ex., determinados fatores da transcrição) e **proteínas citosólicas** possuem cadeias laterais que consistem em uma única GlcNAc ligada a um resíduo de serina ou de treonina (**GlcNAc-Ser[Thr]**).

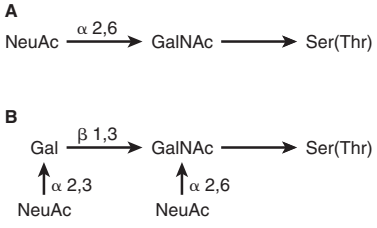


FIGURA 47-2 Estruturas de dois oligossacarídeos *O*-ligados encontrados (A) nas mucinas submaxilares, (B) na fetuína e na sialoglicoproteína da membrana dos eritrócitos humanos. (Modificada e reproduzida, com autorização, de Lennarz WJ: *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans.* Plenum Press, 1980. Reproduzida, com autorização, da Springer Science and Business Media.)

As mucinas apresentam um elevado teor de oligossacarídeos *O*-ligados e exibem sequências de aminoácidos repetidas

As mucinas são glicoproteínas com duas características principais: (1) um elevado teor de **oligossacarídeos *O*-ligados** (o teor de carboidratos das mucinas é geralmente superior a 50%); e (2) a presença de **números variáveis de repetições em série** (*tandem)* (**VNTR**) de sequência peptídica no centro de suas estruturas polipeptídicas, às quais estão ligadas as cadeias de *O*-glicano em grupos (**Figura 47-3**). Essas sequências são ricas em serina, treonina e prolina. Apesar do predomínio dos *O*-glicanos, as mucinas frequentemente contêm várias cadeias de *N*-glicano. Existem mucinas tanto **secretoras** quanto **ligadas à membrana**. As primeiras são encontradas no muco presente nas secreções dos tratos gastrintestinal, respiratório e reprodutivo. O **muco** consiste em cerca de 94% de água e 5% de mucinas, sendo o restante constituído por uma mistura de várias moléculas celulares, eletrólitos e remanescentes de células. Em geral, as mucinas secretoras apresentam uma estrutura oligomérica e, por isso, frequente-

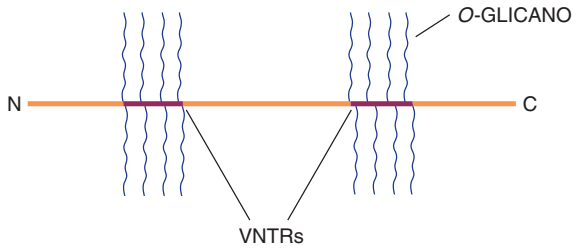


FIGURA 47-3 Esquema muito simplificado de uma mucina. Os *O*-glicanos (em azul) estão ligados a duas das numerosas regiões VNTR (vermelho). Os *N*-glicanos também podem estar presentes. Em geral, as mucinas contêm cisteínas (não ilustradas) próximo às suas extremidades N- e C-terminais, que estão envolvidas na polimerização por meio de pontes de dissulfeto. Outros domínios (D) próximos às extremidades N-terminais também estão envolvidos na polimerização. As mucinas ligadas à membrana contêm domínios transmembrana e citosólicos, além de domínios extracelulares maiores contendo *O*-glicanos.

mente têm uma massa molecular muito alta. Os oligômeros são compostos de monômeros ligados por pontes de dissulfeto. O muco possui grande **viscosidade** e, com frequência, forma um **gel.** Essas qualidades constituem funções de seu teor de mucinas. O alto teor de *O*-ligados confere uma estrutura extensa às mucinas. Isso é explicado, em parte, por interações estéricas entre suas frações de GalNAc e os aminoácidos adjacentes, resultando em um efeito de enrijecimento da cadeia, de modo que as conformações das mucinas muitas vezes são as de bastonetes rígidos. As interações não covalentes intermoleculares entre vários açúcares nas cadeias adjacentes de glicanos contribuem para a formação do gel. O elevado teor de resíduos de **NeuAc** e de **sulfato** encontrado em muitas mucinas lhes confere uma carga negativa. No que concerne às suas funções, as mucinas ajudam a lubrificar e formam uma **barreira física protetora** nas superfícies epiteliais. As mucinas ligadas à membrana participam de várias **interações intercelulares** (p. ex., envolvendo selectinas; ver adiante). Em virtude da densidade das cadeias oligossacarídicas, o acesso das **proteases** às suas estruturas polipeptídicas é difícil, de modo que as mucinas sejam resistentes à sua ação. Além disso, as mucinas tendem a "ocultar" determinados antígenos de superfície. Muitas células neoplásicas formam quantidades excessivas de mucinas; talvez estas possam esconder alguns antígenos de superfície dessas células, protegendo-as, assim, dos mecanismos de vigilância imunológica. As mucinas também transportam epítopos de peptídeos e carboidratos específicos do câncer (um epítopo é um sítio em um antígeno reconhecido por um anticorpo, também denominado determinante antigênico). Alguns desses epítopos têm sido utilizados para estimular uma resposta imune contra as células neoplásicas.

Os **genes** que codificam as estruturas polipeptídicas de diversas mucinas derivadas de vários tecidos (p. ex., pâncreas, intestino delgado, traqueia e brônquios, estômago e glândulas salivares) foram clonados e sequenciados. Esses estudos revelaram novas informações acerca das estruturas polipeptídicas das mucinas (tamanho das repetições em série *tandem*, locais potenciais de *N*-glicosilação, etc) e, por fim, deverão elucidar aspectos de seu controle genético. A **Tabela 47-8** fornece um resumo de algumas propriedades importantes das mucinas.

TABELA 47-8 Algumas propriedades das mucinas

• Encontradas nas secreções dos tratos gastrintestinal, respiratório e reprodutivo, bem como nas membranas de várias células.
• Exibem um elevado teor de cadeias de *O*-glicanos, geralmente contendo NeuAc.
• Possuem sequências repetidas de aminoácidos, ricas em serina, treonina e prolina.
• A estrutura extensa contribui para a sua alta viscoelasticidade.
• Formam uma barreira física protetora nas superfícies epiteliais, estão envolvidas em interações intercelulares e podem conter ou ocultar determinados antígenos de superfície.

A biossíntese das glicoproteínas *O*-ligadas utiliza açúcares nucleotídicos

As cadeias polipeptídicas das glicoproteínas *O*-ligadas e outras glicoproteínas são codificadas por espécies de mRNA; como as glicoproteínas são, em sua maioria, ligadas à membrana ou secretadas, geralmente são traduzidas em polirribossomos ligados à membrana (Capítulo 37). Existem centenas de cadeias oligossacarídicas diferentes do tipo *O*-glicosídico. Essas glicoproteínas são formadas pela **doação sequencial de açúcares a partir dos açúcares nucleotídicos**, como a UDP-GalNAc, a UDP-Gal e o CMP-NeuAc. As enzimas que catalisam esse tipo de reação consistem em **glicoproteína glicosiltransferases** ligadas à membrana. Em geral, a síntese de um tipo específico de ligação requer a atividade de uma transferase específica correspondente. Os fatores que determinam quais os resíduos específicos de serina e de treonina que são glicosilados ainda não foram identificados, porém são provavelmente encontrados na estrutura peptídica que circunda o sítio de glicosilação. As enzimas responsáveis pela montagem das cadeias *O*-ligadas estão situadas no aparelho de Golgi, dispostas sequencialmente em uma linha de montagem, em que as reações terminais ocorrem nos compartimentos *trans*-Golgi.

A **Tabela 47-9** fornece um resumo das principais características da biossíntese das glicoproteínas *O*-ligadas.

TABELA 47-9 Resumo das principais características da *O*-glicosilação

• Envolve um conjunto de glicoproteína glicosiltransferases ligadas à membrana, que atuam de modo sequencial; em geral, cada transferase é específica para determinado tipo de ligação.
• As enzimas envolvidas estão localizadas em vários subcompartimentos do aparelho de Golgi.
• Cada reação de glicosilação envolve o açúcar nucleotídico apropriado.
• O dolicol-P-P-oligossacarídeo não está envolvido, nem as glicosidases; e as reações não são inibidas pela tunicamicina.
• A *O*-glicosilação ocorre após a tradução em determinados resíduos de Ser e Thr.

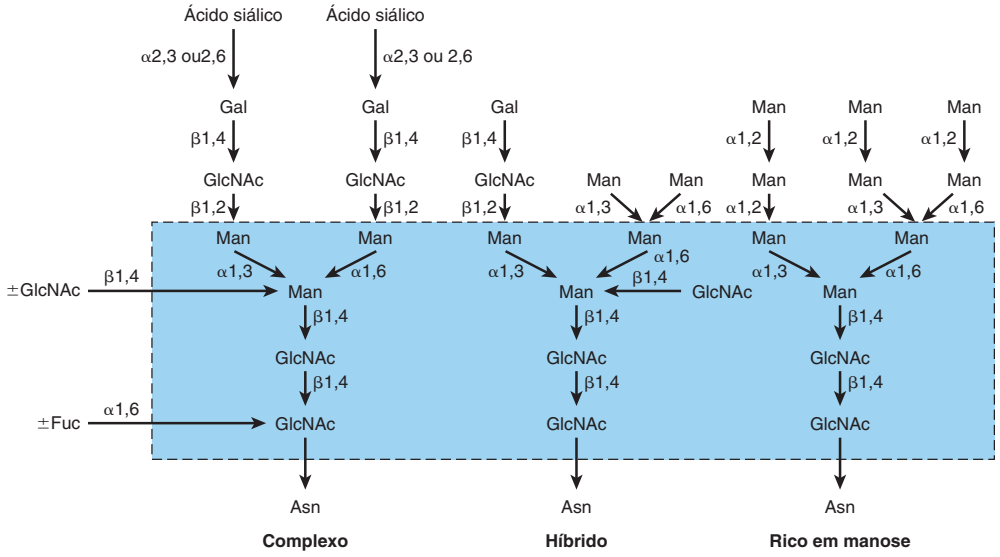


FIGURA 47-4 Estruturas dos principais tipos de oligossacarídeos ligados à asparagina. A área dentro do retângulo engloba o núcleo de pentassacarídeo comum a todas as glicoproteínas *N*-ligadas. (Reproduzida, com autorização, de Kornfeld R, Kornfeld S: Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Annu Rev Biochem 1985;54:631. Copyright © 1985 by Annual Reviews. Reimpressa com autorização.)

AS GLICOPROTEÍNAS *N*-LIGADAS CONTÊM UMA LIGAÇÃO Asn-GLcNAc

As glicoproteínas *N*-ligadas distinguem-se pela presença da ligação Asn-GlcNAc (Figura 47-1). É a principal classe de glicoproteínas e tem sido muito estudada, visto que as proteínas mais facilmente acessíveis (p. ex., proteínas plasmáticas) pertencem, em sua maior parte, a esse grupo. Essa classe inclui as glicoproteínas tanto **ligadas à membrana** quanto **circulantes.** A principal diferença entre esse grupo e a classe anterior, além da natureza do aminoácido ao qual a cadeia oligossacarídica está ligada (Asn *vs* Ser ou Thr), refere-se à sua biossíntese.

Os oligossacarídeos complexos, híbridos e ricos em manose constituem as três principais classes de oligossacarídeos *N*-ligados

Existem três classes principais de oligossacarídeos *N*-ligados: **complexos**, **híbridos** e **ricos em manose** (**Figura 47-4**). Cada tipo compartilha um pentassacarídeo comum, $Man_3GlcNAc_2$ (mostrado na área retangular da Figura 47-4 e também ilustrado na **Figura 47-5**), mas as três classes diferem quanto às suas ramificações externas. A presença do **pentassacarídeo comum** é explicada pelo fato de que todas as três classes compartilham um mecanismo comum inicial de biossíntese. Em geral, as glicoproteínas do tipo complexo contêm resíduos de NeuAc terminais e resíduos subjacentes de Gal e de GlcNAc, em que os últimos frequentemente constituem o dissacarídeo *N*-acetil-lactosamina. As unidades de ***N*-acetil-lactosamina** repetidas – $[Gal\beta1\text{-}3/4GlcNAc\beta1\text{-}3]_n$ (poli-*N*-acetil-lactosaminoglicanos) – são frequentemente encontradas nas cadeias de glicanos N-ligados. As substâncias do grupo sanguíneo I/i pertencem a essa classe. Os oligossacarídeos do tipo complexo contêm, em sua maioria, dois, três ou quatro ramos externos (Figura 47-4), no entanto, foram também descritas estruturas contendo cinco ramos. Com frequência, os ramos oligossacarídicos são designados como antenas, de modo que possam ser encontradas estruturas bi, tri, tetra e penta-antenares. Existe um número extraordinário de cadeias do tipo complexo, e aquela indicada na Figura 47-4 é apenas um de muitos exemplos. Outras cadeias complexas podem terminar com Gal ou com Fuc. Em geral, os oligossacarídeos ricos em manose apresentam de dois a seis resíduos Man adicionais, ligados ao núcleo de pentassacarídeo. As moléculas híbridas apresentam características das duas outras classes.

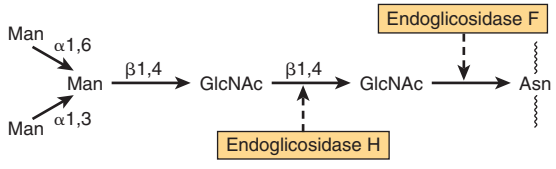


FIGURA 47-5 Ilustração esquemática do núcleo de pentassacarídeo comum a todas as glicoproteínas *N*-ligadas e ao qual podem estar ligadas várias cadeias externas de oligossacarídeos. Os locais de ação das endoglicosidases F e H também estão indicados.

A biossíntese de glicoproteínas *N*-ligadas envolve o dolicol-P-P-oligossacarídeo

Leloir e colaboradores descreveram a existência de um **dolicol pirofosfato oligossacarídeo** (**Dol-P-P-oligossacarídeo**), que, com base nos resultados de pesquisas subsequentes, desempenha um papel-chave na biossíntese das glicoproteínas *N*-ligadas. A cadeia de oligossacarídeo desse composto geralmente apresenta a estrutura $R\text{-}Glc\text{-}NAc_2Man_9Glc_3$ (R = Dol-P-P). Inicialmente, os açúcares desse composto são montados na estrutura do Dol-P-P, e a cadeia de oligossacarídeo é então transferida em bloco para resíduos apropriados de Asn das apoglicoproteínas aceptoras durante a sua síntese nos polirribossomos ligados à membrana. Todos os *N*-glicanos possuem uma estrutura central comum de pentassacarídeo (Figura 47-5).

Para formar as cadeias **ricas em manose**, são removidos apenas os resíduos de Glc, juntamente com alguns dos resíduos periféricos de Man. Para formar uma cadeia oligossacarídica do **tipo complexo**, os resíduos de Glc e quatro dos resíduos de Man são removidos por glicosidases no retículo endoplasmático e no

aparelho de Golgi. Os açúcares característicos das cadeias complexas (GlcNAc, Gal e NeuAc) são acrescentados pela ação de glicosiltransferases específicas localizadas no aparelho de Golgi. O fenômeno pelo qual as cadeias de glicanos das glicoproteínas *N*-ligadas são, em primeiro lugar, parcialmente degradadas e, em seguida, em alguns casos, reconstruídas é conhecido como **processamento dos oligossacarídeos**. As **cadeias híbridas** são formadas por processamento parcial, produzindo cadeias complexas em um dos braços e estruturas de Man no outro braço.

Portanto, as etapas iniciais envolvidas na biossíntese das glicoproteínas *N*-ligadas diferem acentuadamente daquelas que ocorrem na biossíntese das glicoproteínas *O*-ligadas. As primeiras envolvem o Dol-P-P-oligossacarídeo, o que não ocorre com as últimas, conforme descrito anteriormente.

O processo de *N*-glicosilação pode ser subdividido em dois estágios: (1) a montagem do Dol-P-P-oligossacarídeo e a transferência do oligossacarídeo; e (2) o processamento da cadeia oligossacarídica.

Montagem e transferência do dolicol-P-P-oligossacarídeo

Tanto as bactérias quanto as células eucarióticas possuem compostos de **polisoprenol**. Esses compostos participam da síntese dos polissacarídeos bacterianos e da biossíntese das glicoproteínas *N*-ligadas e das âncoras de GPI. O polisoprenol utilizado nos tecidos eucarióticos é o **dolicol**, o qual, depois da borracha, é o hidrocarboneto natural mais longo constituído por uma única unidade repetida. O dolicol é constituído de 17 a 20 unidades isoprenoides repetidas (**Figura 47-6**).

Antes de participar na biossíntese do Dol-P-P-oligossacarídeo, o dolicol precisa ser inicialmente fosforilado para formar o dolicol-fosfato (Dol-P), em uma reação catalisada pela **dolicol-quinase**, que utiliza ATP como doador de fosfato.

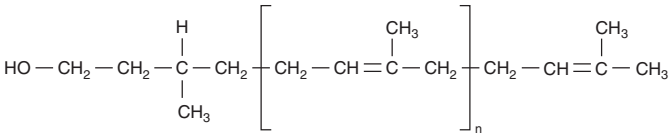


FIGURA 47-6 Estrutura do dolicol. O fosfato do dolicol fosfato está ligado ao grupo álcool primário na extremidade esquerda da molécula. O grupo entre colchetes é uma unidade de isopreno (n = 17 a 20 unidades isoprenoides).

O **dolicol-P-P-GlcNAc** (**Dol-P-P-GlcNAc**) é o lipídeo essencial que atua como aceptor de outros açúcares na montagem do Dol-P-P-oligossacarídeo. É sintetizado nas membranas do retículo endoplasmático, a partir do Dol-P e da UDP-GlcNAc, na seguinte reação, que é catalisada pela Glc-NAc-P--transferase.

$$\text{Dol-P} + \text{UDP-GlcNAc} \rightarrow \text{Dol-P-P-GlcNAc} + \text{UMP}$$

A **Figura 47-7** fornece um resumo dessa reação, que constitui a primeira etapa na montagem do Dol-P-P-oligossacarídeo, bem como das outras reações subsequentes. Os aspectos essenciais das etapas seguintes na montagem do Dol-P-P-oligossacarídeo são:

1. Um segundo resíduo de GlcNAc é acrescentado ao primeiro, utilizando também o UDP-GlcNAc como doador.
2. São acrescentados cinco resíduos de Man, utilizando o GDP--manose como doador.
3. Em seguida, são acrescentados quatro resíduos adicionais de Man, utilizando o Dol-P-Man como doador. O Dol-P-Man é formado pela seguinte reação:

$$\text{Dol-P} + \text{GDP-Man} \rightarrow \text{Dol-P-Man} + \text{GDP}$$

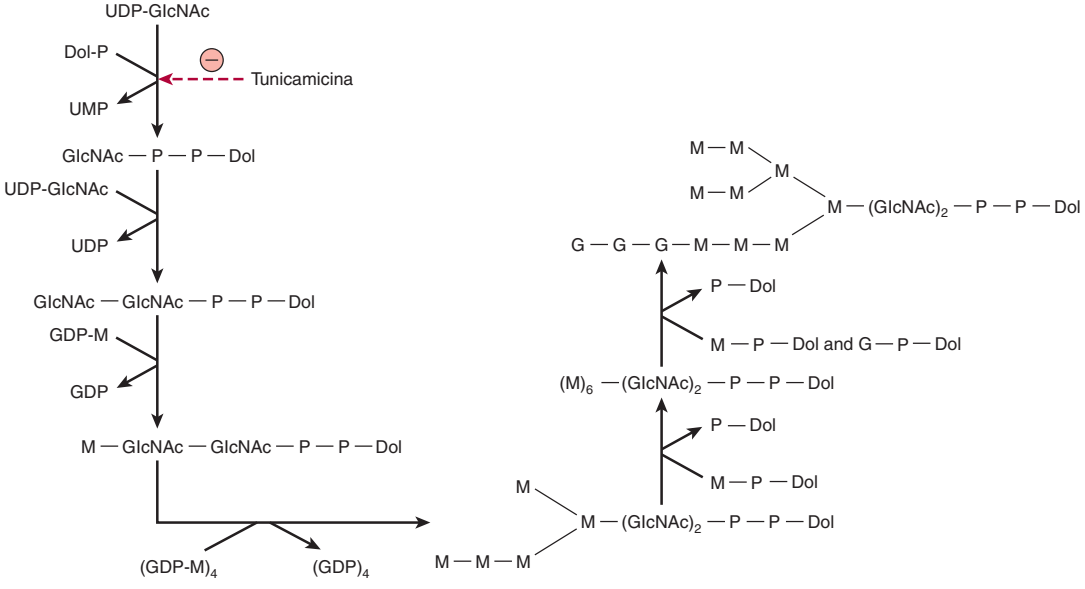


FIGURA 47-7 Via de biossíntese do dolicol-P-P-oligossacarídeo. As ligações específicas formadas estão indicadas na Figura 47-8. Observe que os primeiros cinco resíduos internos de manose são doados pela GDP-manose, enquanto os resíduos mais externos de manose e os resíduos de glicose são doados pela dolicol-P-manose e dolicol-P-glicose. (UDP, uridina-difosfato; Dol, dolicol; P, fosfato; UMP, uridina-monofosfato; GDP, guanosina difosfato.

4. Por fim, os três resíduos de glicose periféricos são doados pelo Dol-P-Glc, que é formado em uma reação análoga àquela anteriormente descrita, exceto que o Dol-P e o UDP--Glc são os substratos.

Convém assinalar que os primeiros sete açúcares (dois resíduos de GlcNAc e cinco resíduos de Man) são doados por açúcares nucleotídicos, enquanto os últimos sete (quatro resíduos de Man e três Glc) acrescentados são doados pelos dolicol-açúcares. O resultado final consiste na montagem do composto ilustrado na **Figura 47-8**, que é designado pela abreviatura Dol-P-P-Glc$NAc_2Man_9Glc_3$.

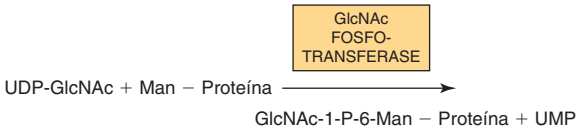
O oligossacarídeo ligado ao dolicol-P-P é transferido em bloco para formar uma ligação *N*-glicosídica com um ou mais resíduos específicos de Asn de uma proteína aceptora que emerge da superfície luminal da membrana do retículo endoplasmático. A reação é catalisada pela **oligossacarídeo:proteína-transferase**, complexo enzimático associado à membrana. A transferase reconhece e transfere qualquer substrato com a estrutura geral Dol-P--P-$(GlcNAc)_2$-R, porém exibe uma forte preferência pela estrutura Dol-P-P-$GlcNAc_2Man_9Glc_3$. Ocorre glicosilação no resíduo de Asn de uma sequência tripeptídica Asn-XSer/Thr, onde X é qualquer aminoácido, exceto a prolina, o ácido aspártico ou o ácido glutâmico. Um sítio tripeptídico contido dentro de uma volta β é favorecido. Apenas cerca de um terço dos resíduos de Asn, que representam sítios aceptores potenciais, é realmente glicosilado, sugerindo que outros fatores, além do tripeptídeo, também são importantes.

As proteínas aceptoras são da classe secretora e da classe de proteínas integrais da membrana. As proteínas citosólicas raramente são glicosiladas. A reação de transferência e os processos subsequentes da glicosilação das glicoproteínas *N*-ligadas, juntamente com suas localizações subcelulares, estão ilustrados na **Figura 47-9**. O outro produto da reação da oligossacarídeo:proteína transferase é o dolicol-P-P, que é posteriormente convertido em dolicol-P por uma fosfatase. O dolicol-P pode atuar novamente como aceptor para a síntese de outra molécula de Dol-P-P-oligossacarídeo.

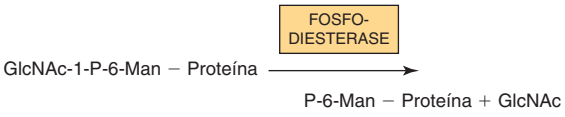
Processamento da cadeia oligossacarídica

1. Fase inicial: a Figura 47-9 ilustra as várias reações envolvidas. A oligossacarídeo: proteína transferase catalisa a reação 1 (ver anteriormente). As reações 2 e 3 envolvem a remoção do resíduo terminal de Glc pela glicosidase I e dos dois resíduos seguintes de Glc pela glicosidase II, respectivamente. No caso das glicoproteínas **ricas em manose**, o processo pode terminar nesse estágio, ou podem ser também removidos até quatro resíduos de Man. Entretanto, para formar cadeias **complexas**, são necessárias etapas adicionais, como as descritas a seguir. Quatro resíduos externos de Man são removidos nas reações 4 e 5 por pelo menos duas manosidases diferentes. Na reação 6, um resíduo de GlcNAc é acrescentado ao resíduo de Man do braço Man 1-3 pela GlcNAc. A ação desta última enzima permite a ocorrência da reação 7, que é catalisada por outra manosidase (α-manosidase II do aparelho de Golgi), resultando em uma redução dos resíduos de Man até o número central de três (Figura 47-5).

Outra via importante está ilustrada nas reações I e II da Figura 47-9. Essa via envolve enzimas destinadas aos lisossomos. Essas enzimas são direcionadas para os lisossomos por um marcador químico específico. Na reação I, um resíduo de GlcNAc-1--P é acrescentado ao carbono 6 de um ou mais resíduos específicos de Man dessas enzimas. A reação é catalisada por uma GlcNAc-fosfotransferase, que utiliza a UDPGlcNAc como doador e gera UMP como outro produto:



Na reação II, a GlcNAc é removida pela reação de uma fosfodiesterase, deixando os resíduos fosforilados de Man na sexta posição:



Os receptores de Man-6-P, localizados no aparelho de Golgi, ligam-se aos resíduos de Man-6-P dessas enzimas e as guiam até os lisossomos. Os fibroblastos de pacientes com **doença da célula I** (ver adiante) apresentam uma grave deficiência de atividade da GlcNAc-fosfotransferase.

2. Fase tardia: para a montagem de uma cadeia oligossacarídica complexa típica, outros açúcares precisam ser acrescentados à estrutura formada na reação 7. Por isso, na reação 8, uma segunda GlcNAc é acrescentada ao resíduo periférico de Man do outro braço da estrutura biantenar ilustrada na Figura 47-9; a enzima que catalisa essa etapa é a GlcNAc-transferase II. As reações 9, 10 e 11 envolvem a adição dos resíduos de Fuc, Gal e NeuAc aos sítios assinalados, em reações catalisadas pelas fucosil-, galactosil- e sialil-transferases, respectivamente. A montagem das cadeias de poli-*N*-acetil-lactosamina exige a presença de outras GlcNAc-transferases.

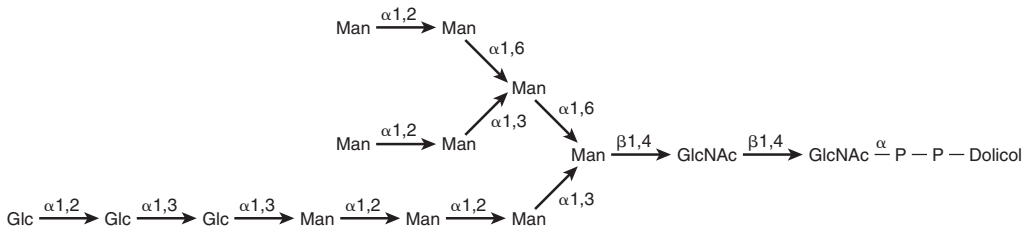


FIGURA 47-8 Estrutura do dolicol-P-P-oligossacarídeo. (Com autorização de Li E, et al: Structure of the lipid-linked oligosaccharide precursor of the complex-type oligosaccharides of the vesicular stomatitis vírus G protein. J Biol Chem 1978;253:7762.)

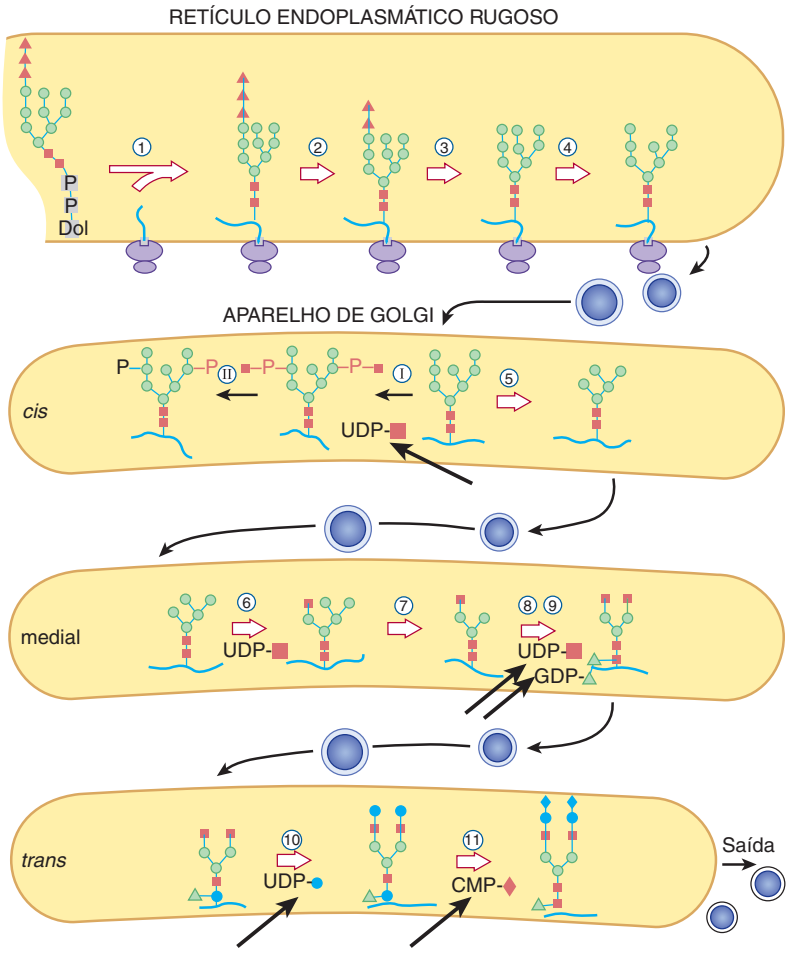


FIGURA 47-9 Via esquemática do processamento dos oligossacarídeos. As reações são catalisadas pelas seguintes enzimas: ① oligossacarídeo:proteína-transferase; ② α-glicosidase I; ③ α-glicosidase II; ④ α-1,2-manosidase do retículo endoplasmático; *N*-acetilglicosaminilfosfotransferase I; *N*-acetilglicosamina-1-fosfodiéster α-*N*-acetilglicosaminidase II; ⑤ α-manosidase I do aparelho de Golgi; ⑥ *N*-acetilglicosaminiltransferase I; ⑦ α-manosidase II do aparelho de Golgi; ⑧ *N*-acetilglicosaminiltransferase II; ⑨ fucosiltransferase; ⑩ galactosiltransferase; ⑪ sialiltransferase. As setas grandes indicam vários açúcares nucleotídicos envolvidos no esquema global. (Quadrado escuro, *N*-acetilglicosamina; círculo transparente, manose; triângulo escuro, glicose; triângulo transparente, fucose; círculo escuro, galactose; losango escuro, ácido siálico.) (Reproduzida, com autorização, de Kornfeld R, Kornfeld S: Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Annu Rev Biochem 1985;54:631. Copyright © 1985 by Annual Reviews. Reimpressa com autorização.)

O retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi constituem os principais locais de glicosilação

Conforme ilustrado na Figura 47-9, o retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi constituem os principais locais envolvidos nos processos de glicosilação. A montagem do Dol-P-P-oligossacarídeo ocorre em ambas as superfícies citoplasmática e luminal das membranas do RE. O acréscimo do oligossacarídeo à proteína ocorre no retículo endoplasmático rugoso, durante ou após a tradução. A remoção da Glc e de alguns dos resíduos periféricos de Man também ocorre no retículo endoplasmático. O aparelho de Golgi é composto por cisternas *cis,* mediais e *trans,* as quais podem ser separadas por procedimentos apropriados de centrifugação. As vesículas que contêm glicoproteínas destacam-se do retículo endoplasmático e são transportadas até a *cis*-Golgi. Vários estudos demonstraram que as enzimas que atuam no processamento das glicoproteínas têm localizações diferenciais nas cisternas de Golgi. Como se pode observar na Figura 47-9, a α-manosidose I de Golgi (que catalisa a reação 5) localiza-se principalmente na *cis*-Golgi, enquanto a GlcNAc-transferase I (que catalisa a reação 6) parece estar localizada no Golgi medial, enquanto as fucosil-, galactosil- e sialil-transferases (que catalisam as reações 9, 10 e 11) estão localizadas principalmente no *trans*-Golgi. A **Tabela 47-10** fornece um resumo das principais características da biossíntese das glicoproteínas *N*-ligadas, as quais devem ser comparadas com aquelas anteriormente descritas (Tabela 47-9) para as glicoproteínas *O*-ligadas.

Alguns intermediários de glicanos formados durante a *N*-glicosilação desempenham funções específicas

A seguir, são citadas diversas funções específicas das cadeias de *N*-glicanos que foram estabelecidas ou que estão em fase de pesquisa: (1) A participação do **sinal de manose-6-P** no endereçamento de determinadas enzimas lisossomais está bem definida (ver parágrafos anteriores e discussão da doença da célula I, mais adiante). (2) É provável que as grandes cadeias de *N*-glicanos presentes nas glicoproteínas recém-sintetizadas possam ajudar a manter essas proteínas em um **estado solúvel** dentro do lúmen do retículo endoplasmático. (3) Foi constatado que uma espécie de cadeias de *N*-glicanos desempenha um papel no dobramento e na retenção de determinadas glicoproteínas no lúmen do retículo endoplasmático. A **calnexina** é uma proteína presente na membrana do retículo endoplasmático, que atua como chaperona (Capítulo 46) e lectina. A ligação à calnexina impede a agregação de uma glicoproteína. Foi constatado que a calnexina liga-se especificamente a determinadas glicoproteínas (p. ex., hemaglutinina [HA] do vírus *influenza*) que possuem a

TABELA 47-10 Resumo das principais características da *N*-glicosilação

- O oligossacarídeo $Glc_3Man_9(GlcNAc)_2$ é transferido do dolicol-P-P-oligossacarídeo em uma reação catalisada pela oligossacarídeo:proteína-transferase, que é inibida pela tunicamicina.
- Ocorre transferência para resíduos específicos de Asn na sequência AsnX-Ser/Thr, onde X é qualquer resíduo, exceto Pro, Asp ou Glu.
- A transferência pode ocorrer de modo cotraducional no retículo endoplasmático.
- O oligossacarídeo ligado à proteína é então parcialmente processado por glicosidases e manosidases; se não forem acrescentados outros açúcares, o composto resulta em uma cadeia rica em manose.
- Se o processamento ocorrer ao longo do heptassacarídeo central ($Man_5[GlcNAc]_2$), as cadeias complexas são sintetizadas pela adição de GlcNAc, pela remoção de dois resíduos de Man e pelo acréscimo sequencial de açúcares específicos em reações catalisadas por transferases específicas (p. ex., GlcNAc, Gal e NeuActransferases), que utilizam açúcares nucleotídicos apropriados.

estrutura central monoglicosilada. Essa espécie é o produto da reação 2 apresentada na Figura 47-9, porém do qual foi removido o resíduo de glicose terminal, deixando apenas a glicose mais interna fixada. A calnexina e a glicoproteína ligada formam um complexo com a **ERp57**, um homólogo da proteína dissulfeto isomerase (PDI), que catalisa o intercâmbio das pontes de dissulfeto, facilitando o dobramento apropriado. A glicoproteína ligada é liberada de seu complexo com calnexina-ERp57 quando a única glicose remanescente é hidrolisada pela glicosidase II e **deixa o RE se estiver corretamente dobrada**. Se **não estiver dobrada se modo apropriado**, uma **glicosiltransferase** do RE reconhece o dobramento incorreto e **glicosila novamente** a glicoproteína, que **volta** a se ligar ao complexo calnexina-Erp57. Se agora ela estiver corretamente dobrada, a glicoproteína é mais uma vez desglicosilada e deixa o RE. Se não for capaz de sofrer um dobramento apropriado, ela é **translocada fora do RE** para o citoplasma, onde é **degradada** (comparar com a Figura 46-8). Esse denominado **ciclo da calnexina** está ilustrado na **Figura 47-10**. Dessa maneira, a calnexina conserva determinadas glicoproteínas parcialmente dobradas (ou mal dobradas) e as libera após a ocorrência de dobramento subsequente. A glicosiltransferase, ao **perceber** o dobramento da glicoproteína e ao proceder à reglicosilação apenas das proteínas mal dobradas, constitui um componente essencial do ciclo. O ciclo da calnexina é importante componente dos **sistemas de controle de qualidade** que operam no lúmen do RE. A proteína solúvel do RE, a **calreticulina**, desempenha uma função semelhante.

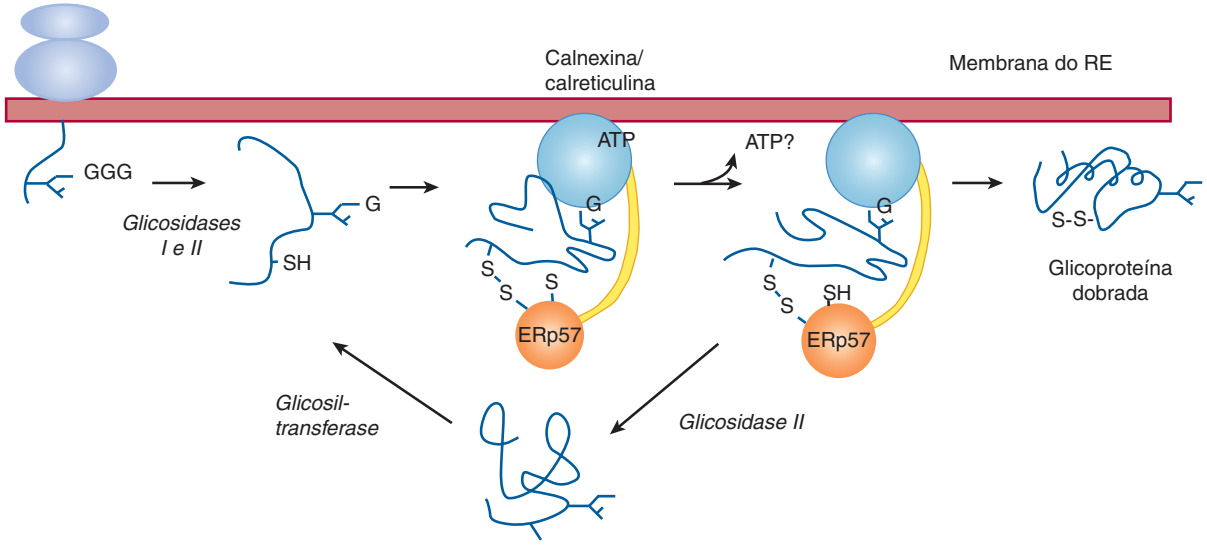


FIGURA 47-10 Modelo do ciclo da calnexina. À medida que a cadeia polipeptídica nascente (em crescimento) entra no RE, determinados resíduos de Asn são glicosilados pela adição de $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ (ver o texto). As duas moléculas mais externas de glicose são removidas pelas ações das glicosidases I e II. Isso expõe a molécula mais interna de glicose, que é reconhecida pelos sítios de lectina da calnexina e calreticulina. Em seu estado ligado ao ATP, a calnexina e a calreticulina ligam-se ao oligossacarídeo monoglicosilado (por meio dos sítios de lectina), bem como a segmentos hidrofóbicos da glicoproteína desdobrada (por meio de seus sítios de ligação de polipeptídeos ou chaperonas). A dissociação da glicoproteína envolve a ação da glicosidase II para remover a glicose terminal, bem como uma mudança na afinidade do sítio de ligação do polipeptídeo. Após dissociação, se o dobramento não ocorrer rapidamente, a glicoproteína é novamente glicosilada por uma glicosiltransferase do RE, que atua apenas nos confôrmeros da proteína não nativa (confôrmero = uma proteína dentre várias conformações possíveis). Em seguida, a glicoproteína reglicosilada pode ligar-se novamente à forma de ATP da calnexina/calreticulina. Por conseguinte, tanto a glicosiltransferase quanto a calnexina/calreticulina atuam como sensores do dobramento. Esse ciclo de ligação e liberação desempenha três funções: impede a agregação das glicoproteínas; conserva os confôrmeros não nativos no RE até a aquisição de uma estrutura nativa (controle de qualidade); e a ligação à calnexina/calreticulina coloca a ERp57 em proximidade com a glicoproteína não nativa. A ERp57 catalisa a formação de pontes de dissulfeto e a isomerização no substrato de glicoproteína, ajudando-a a assumir a sua conformação nativa. Se a glicoproteína não for capaz de sofrer dobramento apropriado, ela é translocada do RE para o citoplasma para degradação proteossômica (comparar com a Figura 46-8). A calreticulina, uma proteína solúvel do RE, desempenha um papel semelhante à calnexina. (G, glicose.) (Figura e legenda gentilmente cedidas pelo Dr. D. B. Williams, e ligeiramente modificadas com sua autorização.)

Vários fatores regulam a glicosilação das glicoproteínas

É evidente que a glicosilação das glicoproteínas constitui um processo complexo que envolve um grande número de enzimas. Foi estimado que cerca de 1% do genoma humano pode estar envolvido com reações de glicosilação. Outro indício de sua complexidade é a existência de mais de dez GlcNAc-transferases distintas descritas, as quais estão envolvidas na biossíntese das glicoproteínas, e, teoricamente, é possível a existência de outras. Além disso, existem múltiplas espécies das outras glicosiltransferases (p. ex., sialiltransferases). Os fatores de controle da primeira etapa da biossíntese das glicoproteínas *N*-ligadas (i.e., **montagem e transferência dos oligossacarídeos**) incluem: (1) a presença de sítios aceptores apropriados nas proteínas, (2) o nível tecidual de Dol-P, e (3) a atividade da oligossacarídeo:proteína-transferase.

A **Tabela 47-11** fornece uma lista de alguns fatores que estão comprovadamente envolvidos na regulação do **processamento dos oligossacarídeos**. Dois desses fatores merecem comentários adicionais. Em primeiro lugar, as **variações entre espécies** das enzimas de processamento assumiram importância em relação à produção de glicoproteínas de uso terapêutico por meio da tecnologia do DNA recombinante. Por exemplo, a **eritropoietina recombinante** (alfaepoetina; EPO) é algumas vezes administrada a pacientes com determinados tipos de anemia crônica, com o objetivo de estimular a eritropoiese. A meia-vida da EPO no plasma é influenciada pela natureza de seu padrão de glicosilação, visto que determinados padrões estão associados a uma meia-vida curta, o que limita consideravelmente o seu período de efetividade terapêutica. Assim, é importante obter a EPO de células hospedeiras que conferem um padrão de glicosilação compatível com a meia-vida normal no plasma. Em segundo lugar, existe um grande interesse na análise das atividades das enzimas de processamento das glicoproteínas em vários tipos de **células neoplásicas**. Com frequência, verifica-se que essas células sintetizam cadeias oligossacarídicas diferentes (p. ex., que muitas vezes exibem maior ramificação) do que aquelas sintetizadas por células de controle. Isso pode ser devido ao fato de que as células neoplásicas apresentam padrões de glicosiltransferases diferentes daqueles apresentados pelas células normais correspondentes, devido a uma ativação ou repressão de genes específicos. As diferenças nas cadeias oligossacarídicas poderiam influenciar as interações de adesão entre as células neoplásicas e as células teciduais normais originais, contribuindo para a ocorrência de metástases. Se for possível encontrar uma correlação entre a atividade de determinadas enzimas de processamento e as **propriedades metastáticas** das células neoplásicas, isso poderia ser importante, uma vez que permitiria a síntese de fármacos para inibir essas enzimas e, consequentemente, as metástases.

Os genes que codificam muitas glicosiltransferases já foram **clonados**, e outros estão sendo investigados. A clonagem revelou novas informações sobre as estruturas das proteínas e dos genes. O estudo dos genes também deverá esclarecer os mecanismos envolvidos em seu **controle transcricional**, e **estudos de *knockout* de genes** estão sendo realizados para avaliar a importância biológica de várias glicosiltransferases.

TABELA 47-11 Alguns fatores que afetam as atividades das enzimas de processamento das glicoproteínas

Fator	Comentário
Tipo celular	Os diferentes tipos de células contêm perfis diferentes de enzimas de processamento.
Enzima anterior	Determinadas glicosiltransferases só atuam em uma cadeia oligossacarídica se ela já tiver sido processada por outra enzima de processamento.[1]
Desenvolvimento	O perfil celular de enzimas de processamento pode modificar-se durante o desenvolvimento se os seus genes forem ativados ou suprimidos.
Localização intracelular	Por exemplo, se uma enzima estiver destinada a ser inserida na membrana do RE (p. ex., HMG-CoA redutase), ela pode nunca encontrar as enzimas de processamento localizadas no aparelho de Golgi.
Conformação da proteína	As diferenças na conformação de diferentes proteínas podem facilitar ou dificultar o acesso das enzimas de processamento em cadeias oligossacarídicas idênticas.
Espécies	As mesmas células (p. ex., fibroblastos) de diferentes espécies podem exibir padrões distintos de enzimas de processamento.
Câncer	As células neoplásicas podem exibir enzimas de processamento diferentes daquelas das células normais correspondentes.

[1]Por exemplo, a ação prévia da GlcNAc-transferase I é necessária para a ação da α-manosidose II de Golgi.

A tunicamicina inibe a *N*-glicosilação, mas não a *O*-glicosilação

Diversos compostos são reconhecidos pela sua capacidade de inibir várias reações envolvidas no processamento das glicoproteínas. Três desses compostos são a **tunicamicina**, a **desoxinojirimicina** e a **swainsonina**. A **Tabela 47-12** apresenta as reações que eles inibem. Esses agentes podem ser utilizados experimentalmente para inibir várias etapas da biossíntese das glicoproteínas e para estudar os efeitos de alterações específicas sobre esse processo. Por exemplo, se as células forem cultivadas na presença de tunicamicina, não ocorrerá glicosilação de suas glicoproteínas normalmente *N*-ligadas. Em determinados casos, foi constatado que a falta de glicosilação aumenta a suscetibilidade dessas pro-

TABELA 47-12 Três inibidores das enzimas envolvidas na *N*-glicosilação das glicoproteínas e seus locais de ação

Inibidor	Local de ação
Tunicamicina	Inibe a GlcNAc-transferase, a enzima que catalisa a adição de GlcNAc ao dolicol-P, a primeira etapa na biossíntese do oligossacarídeo-P-P-dolicol.
Desoxinojirimicina	Inibidor das glicosidases I e II.
Swainsonina	Inibidor da manosidase II.

teínas à proteólise. A inibição da glicosilação não parece produzir um efeito consistente sobre a secreção das glicoproteínas que normalmente são secretadas. Os inibidores do processamento das glicoproteínas listados na Tabela 47-12 não afetam a biossíntese das glicoproteínas *O*-ligadas. A extensão das cadeias *O*-ligadas pode ser impedida pela GalNAc-benzil. Esse composto compete com os substratos das glicoproteínas naturais e, portanto, impede o crescimento da cadeia além da GalNAc.

ALGUMAS PROTEÍNAS ESTÃO ANCORADAS À MEMBRANA PLASMÁTICA POR ESTRUTURAS DE GLICOFOSFATIDILINOSITOL

As glicoproteínas ligadas ao GPI constituem a terceira classe principal de glicoproteínas. A Figura 47-1 ilustra a estrutura do GPI (algumas vezes denominada "base aderente") envolvida na ligação da enzima acetilcolinesterase (ACh esterase) à membrana plasmática dos eritrócitos. As proteínas ligadas ao GPI estão ancoradas na camada externa da membrana plasmática pelos ácidos graxos do fosfatidilinositol (PI). O PI está ligado por uma fração GlcN a uma cadeia de glicano que contém vários açúcares (p. ex., Man, GlcN). Por sua vez, a cadeia oligossacarídica está ligada pela fosforiletanolamina, em uma ligação amida, ao aminoácido carboxiterminal da proteína fixada. O centro da maioria das estruturas de GPI contém uma molécula de fosforiletanolamina, três resíduos de Man, uma molécula de GlcN e uma molécula de fosfatidilinositol, conforme ilustrado a seguir:

Etanolamina-fosfo →6Manα1 →
2Manα1 →6Manα1 →GlcNα1 →
6 − mio − inositol − 1 − fosfolipídeo

Constituintes adicionais são encontrados em muitas estruturas de GPI; por exemplo, a estrutura ilustrada na Figura 47-1 contém uma fosforiletanolamina adicional fixada no meio dos três resíduos de Man do glicano e um ácido graxo extra fixado à GlcN. O significado funcional dessas variações entre as estruturas ainda não foi elucidado. Esse tipo de ligação foi detectado pela primeira vez com o uso da fosfolipase C bacteriana específica de PI (PI-PLC), que, com base nos achados, libera determinadas proteínas da membrana plasmática das células por clivagem da ligação indicada na Figura 41-7. A **Tabela 47-13** fornece exemplos de algumas proteínas que estão ancoradas por esse tipo de ligação. Foram sugeridas pelo menos três funções possíveis desse tipo de ligação. (1) A âncora de GPI pode possibilitar um aumento acentuado da **mobilidade** de uma proteína na membrana plasmática, em comparação com aquela observada para uma proteína que contém sequências transmembrana. Talvez isso não seja surpreendente, já que a âncora de GPI está fixada apenas à camada externa da bicamada lipídica, de modo que está mais livre para difundir-se do que uma proteína ancorada às duas camadas da bicamada. A maior mobilidade pode ser importante para facilitar respostas rápidas a estímulos apropriados. (2) Algumas âncoras de GPI podem conectar-se com vias de **transdução de sinais**. (3) Foi constatado que as estruturas de GPI podem **direcionar** determinadas proteínas para os domínios apicais e também para os domínios basolaterais da membrana plasmática de certas células epiteliais polarizadas. A biossíntese das âncoras de GPI é complexa e começa no retículo endoplasmático. A montagem da âncora de GPI ocorre independentemente por uma série de reações catalisadas por enzimas; em seguida, é transferida para a extremidade carboxiterminal de sua proteína aceptora, acompanhada da clivagem do peptídeo hidrofóbico carboxiterminal preexistente nessa proteína. Esse processo é algumas vezes designado como **glipiação**. Um defeito adquirido em uma etapa inicial da biossíntese da estrutura do GPI foi implicado na etiologia da **hemoglobinúria paroxística noturna** (ver adiante).

TABELA 47-13 Algumas proteínas ligadas ao GPI

• Acetilcolinesterase (membrana eritrocitária)
• Fosfatase alcalina (intestinal, placentária)
• Fator acelerador da decomposição (membrana eritrocitária)
• 5′-Nucleotidase (linfócitos T, outras células)
• Antígeno Thy-1 (cérebro, linfócitos T)
• Glicoproteína de superfície variável (*Trypanosoma brucei*)

OS PRODUTOS FINAIS DA GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs) SÃO CONSIDERADOS IMPORTANTES NA ETIOLOGIA DA LESÃO TECIDUAL NO DIABETES MELITO

A **glicação** refere-se à fixação não enzimática de açúcares (principalmente a glicose) a grupos amino das proteínas, bem como a outras moléculas (p. ex., DNA, lipídeos). A glicação distingue-se da **glicosilação**, pois esta envolve a ligação de açúcares catalisada por enzimas. Quando a glicose se liga a uma proteína, os produtos intermediários formados incluem **bases de Schiff**. Esses produtos podem ser ainda reorganizados pelo **rearranjo de Amadori** em **cetoaminas** (ver **Figura 47-11**). O conjunto completo de reações é conhecido como **reação de Maillard**. Essas reações estão envolvidas no **escurecimento** de certos alimentos devido ao armazenamento ou ao processamento (p. ex., aquecimento). Os produtos finais das reações de glicação são denominados **produtos finais da glicação avançada** (**AGEs**).

O principal interesse médico pelos AGEs consiste na sua capacidade de provocar **lesão tecidual no diabetes melito**, doença em que os níveis de glicemia estão, com frequência, consistentemente elevados, promovendo um aumento da glicação. A determinados intervalos de tempo constantes, o grau de glicação é mais ou menos proporcional ao nível de glicemia. Foi também sugerido que os AGEs estejam envolvidos em outros processos, como o **envelhecimento**.

A glicação do colágeno e de outras proteínas na MEC altera as suas propriedades (p. ex., aumentando a **ligação cruzada do colágeno**). A ligação cruzada pode levar ao acúmulo de várias proteínas plasmáticas nas paredes dos vasos sanguíneos; em particular, o acúmulo de **LDL** pode contribuir para a **aterogênese**.

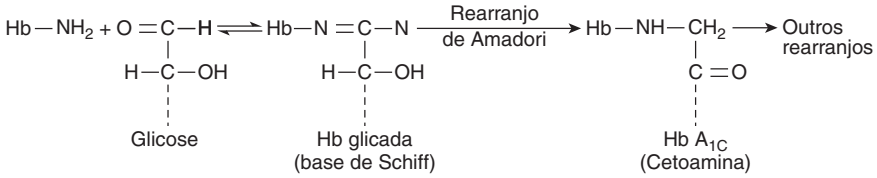


FIGURA 47-11 Formação dos AGEs a partir da glicose. A figura mostra a glicose interagindo com o grupo amino da hemoglobina (Hb), formando uma base de Schiff. Essa base está sujeita ao rearranjo de Amadori, com formação de uma cetoamina. Podem ocorrer rearranjos adicionais, levando à formação de outros AGEs.

Os AGEs parecem estar envolvidos nas lesões **microvascular** e **macrovascular** no diabetes melito (**Figura 47-12**). As células endoteliais e os macrófagos também apresentam receptores de AGEs em suas superfícies. A captação de proteínas glicadas por esses receptores pode ativar a transcrição do fator **NF-κB** (ver Capítulo 50), gerando uma variedade de **citocinas** e **moléculas pró-inflamatórias**. Desse modo, acredita-se que os AGEs representem um fator significativo na contribuição de alguns dos achados patológicos no diabetes. A fixação não enzimática da glicose à hemoglobina B presente nos eritrócitos (ou seja, formação de **HbA_{1c}**) ocorre nos indivíduos normais, porém está aumentada nos pacientes com diabetes melito cujos níveis de glicemia estão elevados. Conforme discutido no Capítulo 6, a determinação da HbA_{1c} passou a ser uma parte muito importante no **manejo de pacientes com diabetes melito**.

AS GLICOPROTEÍNAS ESTÃO ENVOLVIDAS EM MUITOS PROCESSOS BIOLÓGICOS E EM MUITAS DOENÇAS

Conforme relacionado na Tabela 47-1, as glicoproteínas desempenham numerosas funções diferentes; algumas já foram discutidas neste capítulo, enquanto outras são descritas em outras partes desse texto (p. ex., moléculas de transporte, moléculas imunológicas e hormônios). Nesta seção, a sua participação em dois processos específicos – a fertilização e a inflamação – será descrita de modo sucinto. Além disso, são resumidos os mecanismos básicos de diversas doenças causadas por anormalidades na síntese e na degradação das glicoproteínas.

As glicoproteínas são importantes na fertilização

Para alcançar a membrana plasmática de um ovócito, o espermatozoide precisa atravessar a **zona pelúcida** (**ZP**), envoltório acelular transparente e espesso que circunda o ovócito. A zona pelúcida contém três glicoproteínas importantes: ZP1, ZP2 e ZP3. Destaca-se, em particular, a ZP3, uma glicoproteína *O*-ligada que atua como receptor do espermatozoide. Uma proteína presente na superfície dos espermatozoides, possivelmente a galactosiltransferase, interage especificamente com as cadeias oligossacarídicas da ZP3; pelo menos em algumas espécies (p. ex., o camundongo), essa interação por sinalização transmembrana induz a **reação acrossômica**, na qual são liberadas enzimas, como proteases e hialuronidase, bem como outros componentes do acrossomo do espermatozoide. A liberação dessas enzimas ajuda o espermatozoide a atravessar a zona pelúcida e a alcançar a membrana plasmática (MP) do ovócito. Nos *hamsters,* foi constatada a importância de outra glicoproteína, a PH-30, na ligação da MP do espermatozoide à MP do ovócito, bem como na fusão subsequente das duas membranas. Essas interações possibilitam a entrada do espermatozoide e, consequentemente, a fertilização do ovócito. Pode ser possível **inibir a fertilização** pelo desenvol-

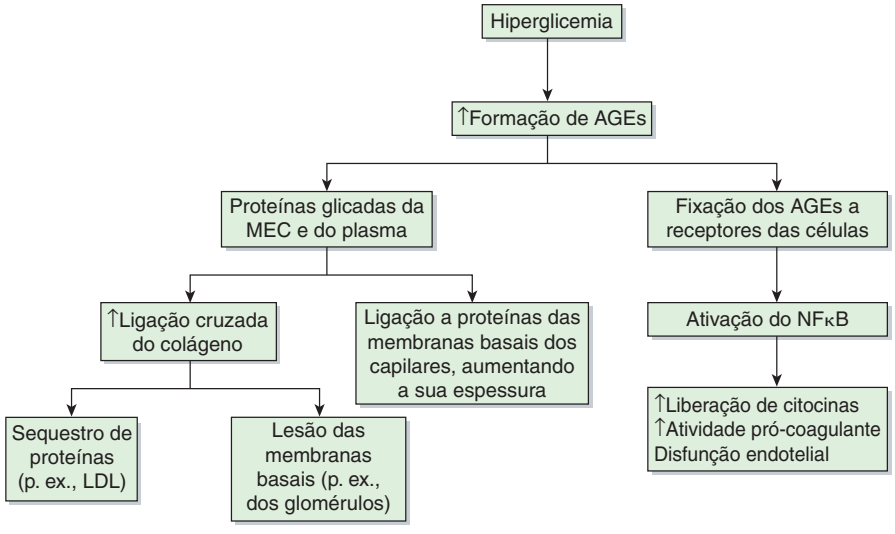


FIGURA 47-12 Algumas consequências da formação de AGEs. A hiperglicemia (p. ex., a que ocorre no diabetes inadequadamente controlado) leva à formação de AGEs. Esses produtos podem ocorrer em proteínas da MEC ou no plasma. Na MEC, podem causar aumento da ligação cruzada do colágeno, podendo sequestrar proteínas, como as LDL (o que contribui para a aterogênese) e causar lesão das membranas basais nos rins e em outros locais. Pode ocorrer também espessamento da membrana basal, devido à ligação de proteínas glicadas. Os AGEs podem ligar-se a receptores de AGEs nas células, ativando o NFκB (ver Capítulo 50), com várias consequências (ilustradas). A lesão das membranas basais renais, o espessamento dessas membranas nos capilares e a disfunção endotelial são observados no diabetes melito não controlado.

vimento de fármacos ou anticorpos capazes de interferir nas funções normais da ZP3 e PH-30 e que, desse modo, atuariam como agentes contraceptivos.

As selectinas desempenham papéis essenciais na inflamação e no endereçamento (*homing*) dos linfócitos

Os **leucócitos** desempenham papéis importantes em muitos fenômenos inflamatórios e imunológicos. As primeiras etapas em muitos desses fenômenos consistem em interações entre os leucócitos circulantes e as **células endoteliais** antes da saída dos leucócitos da circulação. As pesquisas realizadas para identificar moléculas específicas nas superfícies das células envolvidas nessas interações revelaram que os leucócitos e as células endoteliais apresentam, em suas superfícies, lectinas específicas, denominadas **selectinas**, que participam na sua adesão intercelular. A **Tabela 47-14** fornece um resumo das características das três classes principais de selectinas. As selectinas são proteínas transmembranas de cadeia simples de ligação do Ca^{2+} que contêm determinado número de domínios (**Figura 47-13**). Suas extremidades aminoterminais apresentam o domínio de lectina, que está envolvido na ligação a ligantes de carboidratos específicos.

O processo de adesão dos neutrófilos às células endoteliais das vênulas pós-capilares pode ser dividido em quatro estágios, como mostra a **Figura 47-14**. O primeiro estágio basal é seguido de **redução da velocidade** ou **rolamento** dos neutrófilos, um processo mediado pelas selectinas. Ocorrem interações entre a L-selectina e CD34 e GlyCAM-1 na superfície dos neutrófilos ou outras glicoproteínas na superfície endotelial. Inicialmente, essas interações específicas são de curta duração, e a ligação global é de afinidade relativamente baixa, possibilitando o rolamento. Entretanto, durante esse estágio, ocorre **ativação** dos neutrófilos por vários mediadores químicos (discutidos adiante), resultando em uma alteração do formato dessas células e em sua adesão firme ao endotélio. Outro conjunto de **moléculas de adesão** está envolvido no processo de adesão firme, isto é, a LFA-1 e Mac-1 nos neutrófilos e as ICAM-I e ICAM-2 nas células endoteliais. A LFA-1 e Mac-1 consistem em integrinas CD11/CD18 (ver no Capítulo 52 uma discussão sobre as integrinas), enquanto a ICAM-1 e a ICAM-2 são membros da superfamília das imunoglobulinas. O quarto estágio é a **transmigração** dos neutrófilos através da parede endotelial. Para que isso ocorra, os neutrófilos introduzem pseudópodes dentro das junções entre as células endoteliais, espremem-se por essas junções, atravessam a membrana basal e, por fim, ficam livres para migrar no espaço extravascular. Foi constatado que a molécula de adesão das células endoteliais-plaquetas-1(PECAM-1) está localizada nas junções das células endoteliais e, portanto, pode desempenhar um papel na transmigração. Foram identificadas diversas biomoléculas que estão envolvidas na **ativação** dos neutrófilos e das células endoteliais, incluindo o fator de necrose tumoral, várias interleucinas, o fator de ativação das plaquetas (PAF), o leucotrieno B_4, e determinados fragmentos do complemento. Esses compostos estimulam diversas vias de sinalização, resultando em modificações na morfologia e função das células, sendo alguns também quimiotáticos. Uma alteração funcional importante é o **recrutamento das selectinas** para a superfície celular, visto que, em alguns casos, as selectinas são armazenadas em grânulos (p. ex., nas células endoteliais e nas plaquetas).

TABELA 47-14 Algumas moléculas envolvidas nas interações entre os leucócitos e as células endoteliais

Molécula	Célula	Ligantes
Selectinas		
L-selectina	PMN, linfócitos	CD34, Gly-CAM-[1], sialil--Lewis^x e outros
P-selectina	CE, plaquetas	Ligante de glicoproteína da P-selectina-1 (PSGL-1), sialil-Lewis^x e outros
E-selectina	CE	Sialil-Lewis^x e outros
Integrinas		
LFA-1	PMN, linfócitos	ICAM-1, ICAM-2
(CD11a/CD18)		
Mac-1	PMN	ICAM-1 e outros
(CD11b/CD18)		
Superfamília das imunoglobulinas		
ICAM-1	Linfócitos, CE	LFA-1, Mac-1
ICAM-2	Linfócitos, CE	LFA-1
PECAM-1	CE, PMN, linfócitos	Várias plaquetas

Fonte: Modificada, com autorização, de Albelda SM, Smith CW, Ward PA: Adhesion molecules and inflammatory injury. FASEB J 1994;8:504.
Abreviaturas: CD, grupo de diferenciação; CE, célula endotelial; ICAM, molécula de adesão intercelular; LFA-1, antígeno associado à função dos linfócitos 1; PECAM-1, molécula de adesão das células endoteliais-plaquetas-1; PMN, leucócitos polimorfonucleares.
[1]Trata-se de ligantes para a L-selectina dos linfócitos; os ligantes da L-selectina dos neutrófilos aparentemente não foram identificados.

A precisa natureza química de alguns dos ligantes envolvidos nas interações selectina-ligante já foi definida. Todas as três selectinas ligam-se a **oligossacarídeos sialilados e fucosilados** e, em particular, todas se ligam ao **sialil-Lewis^x** (**Figura 47-15**), uma estrutura presente tanto nas glicoproteínas quanto nos glicolipídeos. Ainda não foi estabelecido se esse composto é um verdadeiro ligante envolvido *in vivo*. As moléculas sulfatadas, como os sulfatídeos (Capítulo 15), podem ser ligantes em determinadas circunstâncias. Esse conhecimento básico está sendo utilizado na

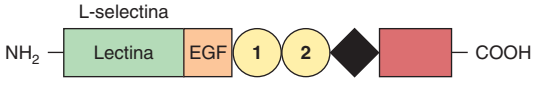


FIGURA 47-13 Ilustração esquemática da estrutura da L-selectina humana. A porção extracelular contém um domínio aminoterminal homólogo às lectinas do tipo C e um domínio adjacente semelhante ao fator de crescimento epidérmico. Esses domínios são seguidos de um número variável de módulos semelhantes aos reguladores do complemento (círculos numerados) e uma sequência transmembrana (losango preto). Na extremidade carboxiterminal, existe uma sequência citoplasmática curta (retângulo vermelho). As estruturas das P- e E-selectinas assemelham-se àquela ilustrada, exceto que essas contêm maior número de módulos reguladores do complemento. Os números dos aminoácidos nas L-, P- e E-selectinas, deduzidos a partir das sequências do cDNA, são 385, 789 e 589, respectivamente. (Reproduzida, com autorização, de Bevilacqua MP, Nelson RM: Selectins. J Clin Invest 1993;91:370.)

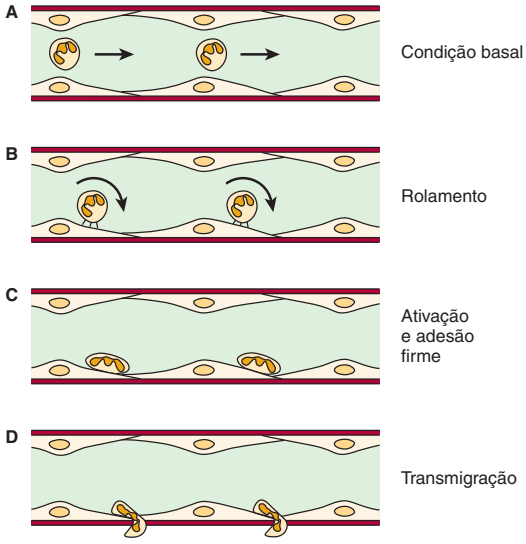


FIGURA 47-14 Ilustração esquemática das interações entre os neutrófilos e as células endoteliais. (**A**) Condições basais: os neutrófilos não aderem à parede do vaso. (**B**) O primeiro evento consiste em redução da velocidade ou rolamento dos neutrófilos dentro do vaso (vênula), que é mediado por selectinas. (**C**) Ocorre ativação, resultando em adesão firme dos neutrófilos às superfícies das células endoteliais e também na aquisição de um formato achatado. Isso requer a interação das integrinas CD18 ativadas nos neutrófilos com a ICAM-1 presente no endotélio. (**D**) Em seguida, os neutrófilos migram através das junções das células endoteliais e alcançam o tecido intersticial; esse processo requer a participação da PECAM-1. A quimiotaxia também está envolvida nesse último estágio. (Reproduzida, com autorização, de Albelda SM, Smith CW, Ward PA: Adhesion molecules and inflammatory injury. FASEB J 1994;8;504.)

tentativa de sintetizar compostos capazes de bloquear as interações selectina-ligante e, assim, de inibir a resposta inflamatória. As abordagens incluem a administração de anticorpos monoclonais específicos ou de análogos quimicamente sintetizados do sialil-Lewis^x, ambos os quais se ligam às selectinas. Com frequência, as **células neoplásicas** exibem sialil-Lewis^x e outros ligantes de selectina em suas superfícies. Acredita-se que esses ligantes possam desempenhar um papel na invasão e na metástase das células neoplásicas.

As anormalidades na síntese das glicoproteínas estão na base de determinadas doenças

A **Tabela 47-15** fornece uma lista de vários distúrbios nos quais as anormalidades na síntese das glicoproteínas são importantes. Conforme assinalado anteriormente, muitas **células neoplásicas** exibem diferentes perfis de cadeias oligossacarídicas em suas superfícies, algumas das quais podem contribuir para as metástases.

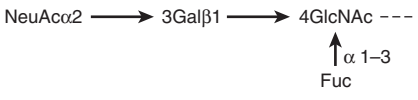


FIGURA 47-15 Representação esquemática da estrutura do sialil-Lewis^x.

TABELA 47-15 Algumas doenças causadas ou envolvendo anormalidades na biossíntese das glicoproteínas

Doença	Anormalidade
Câncer	O aumento na ramificação dos glicanos de superfície celular ou a apresentação de ligantes de selectinas podem ser importantes nas metástases.
Distúrbios congênitos da glicosilação[1]	Ver Tabela 47-16.
HEMPAS[2] (OMIM 224100)	Anormalidades de determinadas enzimas (p. ex., manosidase II e outras) envolvidas na biossíntese dos *N*-glicanos, afetando particularmente a membrana eritrocitária.
Deficiência de adesão dos leucócitos, tipo II (OMIM 266265)	Provavelmente mutações que afetam um transportador de GDP-fucose localizado no aparelho de Golgi, resultando em fucosilação deficiente.
Hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) (OMIM 311770)	Defeito adquirido na biossíntese das estruturas do GPI[3] do fator acelerador de degradação (DAF) e CD59.
Doença da célula I (OMIM 252500)	Deficiência de GlcNAc-fosfotransferase, resultando em direcionamento anormal de determinadas enzimas lisossômicas.

[1]O número OMIM do distúrbio congênito de glicosilação tipo Ia é 212065.
[2]Multinuclearidade eritroblástica hereditária com teste positivo de lise com soro acidificado (anemia diseritropoética congênita tipo III). É uma forma relativamente branda de anemia. Reflete, pelo menos em parte, a presença, nas membranas dos eritrócitos, de várias glicoproteínas com cadeias anormais de *N*-glicanos, contribuindo para a suscetibilidade à lise.
[3]Glicosilfosfatidilinositol.

Os **distúrbios congênitos de glicosilação** (**DCG**) constituem um grupo de distúrbios de considerável interesse atual. A **Tabela 47-16** fornece um resumo das principais características desses distúrbios.

A **deficiência de adesão dos leucócitos** (**DAL**) **II** é um distúrbio raro, provavelmente causado por mutações que afetam a atividade de um transportador de GDP-fucose localizado no aparelho de Golgi. Essa doença pode ser considerada um distúrbio congênito da glicosilação. A ausência de ligantes fucosilados para as selectinas leva a uma acentuada diminuição no rolamento dos neutrófilos. Os pacientes apresentam infecções bacterianas recorrentes e potencialmente fatais, bem como retardos psicomotor e mental. Essa doença parece responder à administração oral de fucose.

A **multinuclearidade eritroblástica hereditária com teste de lise com soro acidificado positivo** – anemia diseritropoiética congênita tipo II – é outro distúrbio no qual se acredita estejam envolvidas anormalidades no processamento dos N-glicanos. Foi sustentado que alguns casos são devido a defeitos da α-manosidase II.

A **HPN** é uma anemia leve adquirida, caracterizada pela presença de hemoglobina na urina, devido à hemólise dos eritrócitos, particularmente durante o sono. Este último fenômeno pode refletir uma ligeira queda do pH plasmático durante o sono, aumentando a suscetibilidade à lise pelo sistema complemento (Capítulo 50). O defeito básico na HPN consiste na aquisição de mutações somáticas no gene *PIG-A* (para glicano PI da classe A) de determinadas células hematopoiéticas. O produto desse gene parece ser a enzima que liga a glicosamina ao PI na estrutura do

TABELA 47-16 Principais características dos distúrbios congênitos da glicosilação

• Distúrbios autossômicos recessivos.
• Distúrbios multissistêmicos que provavelmente não eram reconhecidos no passado.
• Em geral, acometem o sistema nervoso central, resultando em retardo psicomotor, bem como em outras manifestações.
• Os distúrbios do tipo I são causados por mutações de genes que codificam a enzimas (p. ex., fosfomanomutase-2 [PMM-2], que provoca o DCG Ia) envolvidas na síntese do dolicol-P-P-oligossacarídeo.
• Os distúrbios do tipo II são causados por mutações de genes que codificam enzimas (p. ex., GlcNAc-transferase-2, que causa DCG IIa) envolvidas no processamento das cadeias de *N*-glicanos.
• Pelo menos 15 distúrbios distintos foram identificados.
• A focalização isoelétrica da transferrina constitui um teste bioquímico útil para ajudar no diagnóstico desses distúrbios; o truncamento das cadeias oligossacarídicas dessa proteína altera o seu padrão de focalização isoelétrica.
• A manose oral demonstrou ser benéfica no tratamento do DCG Ia.

Abreviatura: DCG, distúrbio congênito da glicosilação.

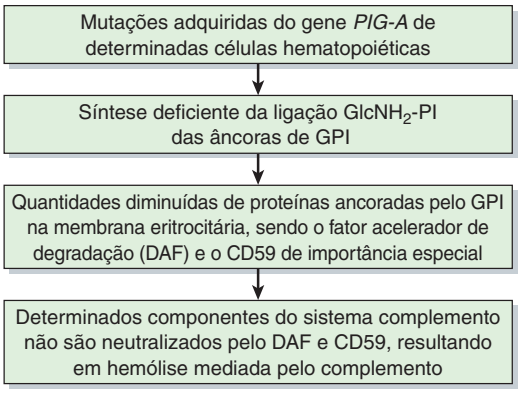


FIGURA 47-16 Esquema da etiologia da hemoglobinúria paroxística noturna (OMIM 311770).

GPI (Figura 47-1). Assim, as proteínas ancoradas por uma ligação GPI estão deficientes na membrana eritrocitária. Duas proteínas são de interesse particular: o **fator acelerador de degradação** e outra proteína, designada como **CD59**. Normalmente, essas proteínas interagem com determinados componentes do sistema complemento (Capítulo 50) para impedir as ações hemolíticas deste último. Todavia, quando estão deficientes, o sistema complemento pode atuar sobre a membrana eritrocitária, causando hemólise. Um anticorpo monoclonal contra o C5, o componente terminal do sistema complemento, demonstrou ser útil no tratamento da HPN ao inibir a cascata do complemento. A HPN pode ser diagnosticada com relativa facilidade, visto que os eritrócitos são muito mais sensíveis à hemólise no soro normal acidificado em pH de 6,2 (teste de Ham); o sistema complemento é ativado nessas condições, porém as células normais não são afetadas. A **Figura 47-16** fornece um resumo da etiologia da HPN.

O estudo das **distrofias musculares congênitas** (**DMC**) revelou que algumas delas (p. ex., a síndrome de Walker-Warburg, a doença do músculo-olho-cérebro, a DMC de Fukuyama) resultam de defeitos na síntese de glicanos da proteína α-distroglicano (α-DG). Essa proteína projeta-se a partir da membrana superficial das células musculares e interage com a laminina-2 (merosina) da lâmina basal (ver Figura 49-11). Se os glicanos do α-DG não forem sintetizados de modo correto (em consequência de mutações dos genes que codificam determinadas glicosiltransferases), isso resulta em uma interação defeituosa do α-DG com a laminina, levando ao desenvolvimento de DMC.

A **artrite reumatoide** está associada a uma alteração na glicosilação das moléculas circulantes de imunoglobulina G (IgG) (Capítulo 50), de modo que elas carecem de galactose em suas regiões Fc e terminam com GlcNAc. A **proteína de ligação da manose** (MBP, que não deve ser confundida com o receptor de manose-6-P), uma C-lectina sintetizada pelos hepatócitos e secretada na circulação, liga-se à manose, à GlcNAc e a outros açúcares. Por conseguinte, pode ligar-se a moléculas de IgG desprovidas de galactosil, que ativam subsequentemente o sistema complemento (ver Capítulo 50), contribuindo para a inflamação crônica das membranas sinoviais das articulações.

A **MBP** também pode ligar-se aos açúcares anteriormente citados quando estes estão presentes nas superfícies de determinadas bactérias, fungos e vírus, preparando esses patógenos para opsonização ou destruição pelo sistema complemento. Trata-se de um exemplo de **imunidade inata**, que não envolve as imunoglobulinas nem os linfócitos T. A deficiência dessa proteína em lactentes de pouca idade, em consequência de mutação, os torna muito suscetíveis a **infecções recorrentes**.

A doença da célula I resulta de um direcionamento incorreto das enzimas lisossomais

Conforme assinalado anteriormente, a Man-6-P atua como marcador químico para direcionar determinadas enzimas lisossomais para essa organela. A análise de fibroblastos em cultura obtidos de pacientes com doença da célula I (célula de inclusão) desempenhou um importante papel na elucidação da função da Man-6-P. A doença da célula I é um distúrbio raro, caracterizado por grave retardo psicomotor progressivo e por uma variedade de sinais físicos, levando frequentemente à morte na primeira década de vida. Foi constatado que células em cultura de pacientes com doença da célula I carecem de quase todas as enzimas lisossomais normais; portanto, os lisossomos acumulam muitos tipos diferentes de moléculas não degradadas, com consequente formação de corpúsculos de inclusão. Foi observado que as amostras de plasma de pacientes com a doença exibem atividades muito altas das enzimas lisossomais; isso indicou que as enzimas estavam sendo sintetizadas, porém não conseguiam alcançar o seu destino intracelular apropriado e, em vez disso, eram secretadas. Foi constatado que as células em cultura de paciente com essa doença captavam enzimas lisossomais obtidas de indivíduos normais e acrescentadas exogenamente, indicando que as células continham um receptor normal em suas superfícies para a captação das enzimas lisossomais por endocitose. Além disso, esse achado sugeriu que as enzimas lisossomais de pacientes com doença da célula I **podem carecer de um marcador de reconhecimento**. Estudos adicionais revelaram que as enzimas lisossomais de indivíduos normais apresentam o marcador

de reconhecimento Man-6-P descrito anteriormente, que interage com uma proteína intracelular específica, o receptor de Man-6-P. Foi reconhecido que células em cultura de pacientes com doença da célula I apresentavam **deficiência** da atividade da **GlcNAc-fosfotransferase** localizada no *cis*-Golgi, explicando como as suas enzimas lisossômicas não conseguiam adquirir o marcador Man-6-P. Atualmente, sabe-se que existem **duas proteínas receptoras de Man-6-P**, uma com elevada massa molecular (275 kDa) e outra com baixa massa molecular (46 kDa). Essas proteínas são **lectinas, que reconhecem o Man-6-P**. A primeira não depende de cátions e liga-se também ao IGF-II (razão pela qual foi designada como receptor de Man-6-P-IGFII), enquanto a segunda é dependente de cátions em algumas espécies e não se liga ao IGF-II. Aparentemente, ambos os receptores atuam na seleção intracelular de enzimas lisossomais em vesículas revestidas por clatrina, que ocorre no *trans*-Golgi após a síntese de Man-6-P no *cis*-Golgi. Em seguida, essas vesículas deixam o aparelho de Golgi e fundem-se com um compartimento pré-lisossomal. O **pH baixo** desse compartimento provoca **dissociação** das enzimas lisossomais de seus receptores e a sua entrada subsequente nos lisossomos. Os receptores são reciclados e reutilizados. Apenas o receptor menor atua na endocitose das enzimas lisossomais **extracelulares**, que é uma via menor de localização lisossomal. Nem todas as células empregam o receptor de Man-6-P para direcionar as suas enzimas lisossomais (p. ex., os hepatócitos empregam uma via diferente, porém não definida); além disso, nem todas as enzimas lisossomais são direcionadas por esse mecanismo. Dessa maneira, as pesquisas bioquímicas relativas à doença da célula I não apenas levaram à elucidação de suas bases, mas também contribuíram de modo significativo para o conhecimento sobre como as proteínas recém-sintetizadas são direcionadas para organelas específicas, que, neste caso, são os lisossomos. A **Figura 47-17** fornece um resumo da etiologia da doença da célula I.

A **pseudopolidistrofia de Hurler** é outra doença genética estreitamente relacionada com a doença da célula I. Trata-se de um **distúrbio mais leve**, e os pacientes podem sobreviver até a idade adulta. Os estudos realizados revelaram que a **GlcNAc-fosfotransferase** envolvida na doença da célula I possui vários domínios, incluindo um domínio catalítico e outro que reconhece e interage especificamente com enzimas lisossomais. Foi proposto que o defeito na pseudopolidistrofia de Hurler reside no último domínio, e que a conservação de alguma atividade catalítica resulta em um distúrbio mais leve.

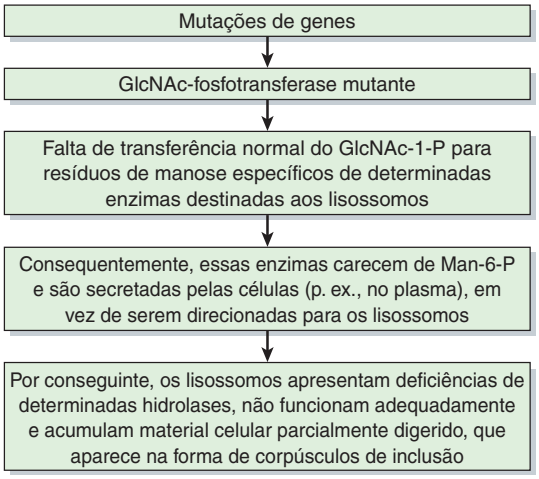


FIGURA 47-17 Resumo da etiologia da doença da célula I (OMIM 252500).

As deficiências genéticas das hidrolases lisossomais das glicoproteínas provocam doenças como a α-manosidose

À semelhança da maioria das outras moléculas biológicas, as glicoproteínas são sintetizadas e degradadas (i.e., renovação). A decomposição das cadeias oligossacarídicas das glicoproteínas envolve um conjunto de hidrolases lisossomais, como a α-neuraminidase, a β-galactosidase, a β-hexosaminidase, as α- e β-manosidases, a α-*N*-acetilgalactosaminidase, a α-fucosidase, a endo-β-*N*-acetilglicosaminidase e a aspartilglicosaminidase. Os locais de ação das últimas duas enzimas estão indicados na legenda da Figura 47-5. Podem ocorrer defeitos geneticamente determinados nas atividades dessas enzimas, resultando em decomposição anormal das glicoproteínas. O acúmulo dessas glicoproteínas degradadas nos tecidos pode levar ao desenvolvimento de várias doenças. Entre as mais conhecidas dessas doenças estão a manosidose, a fucosidose, a sialidose, a aspartilglicosaminúria e a doença de Schindler, causadas, respectivamente, pelas deficiências de α-manosidase, α-fucosidase, α-neuraminidase, aspartilglicosaminidase e α-*N*-acetilgalactosaminidase. Essas doenças, relativamente incomuns, apresentam uma variedade de manifestações; a **Tabela 47-17** fornece uma lista de algumas de suas principais características. O fato de que todos os pacientes acometidos por esses distúrbios apresentam sinais relativos ao **sistema nervoso central** reflete a importância das glicoproteínas no desenvolvimento e na função normal desse sistema.

TABELA 47-17 Principais características de algumas doenças[1] causadas por deficiências de glicoproteína hidrolases[2]

• Em geral, caracterizam-se por retardo mental ou outras anormalidades neurológicas e, em alguns distúrbios, por traços grosseiros ou visceromegalia (ou ambos).
• A gravidade varia de leve a rapidamente progressiva.
• Herança autossômica recessiva.
• Podem exibir distribuição étnica (p. ex., a aspartilglicosaminúria é comum na Finlândia).
• Vacuolização das células observadas à microscopia em alguns distúrbios.
• Presença de produtos de degradação anormais (p. ex., oligossacarídeos que se acumulam, devido à deficiência enzimática) na urina, detectáveis por TLC e passíveis de caracterização por GLC-MS.
• O diagnóstico definitivo é estabelecido por ensaio da enzima apropriada, geralmente utilizando leucócitos.
• Possibilidade de diagnóstico pré-natal por ensaios enzimáticos apropriados.
• No momento atual, não existe nenhum tratamento definitivo.

[1] α-Manosidose, β-manosidose, fucosidose, sialidose, aspartilglicosaminúria e doença de Schindler.
[2] Números OMIM: α-manosidose, 248500; β-manosidose, 248510; fucosidose, 230000; sialidose, 256550; aspartilglicosaminúria, 208400; doença de Schindler, 609241.

OS GLICANOS DOS GLICOCONJUGADOS ESTÃO ENVOLVIDOS NA LIGAÇÃO DOS VÍRUS, DAS BACTÉRIAS E DE OUTROS PARASITAS ÀS CÉLULAS HUMANAS

Uma importante característica dos glicanos, que explica muitas de suas ações biológicas, consiste na sua **ligação** específica a uma variedade de moléculas, como proteínas ou outros glicanos. Em consequência, eles também têm a capacidade de ligar-se a determinados vírus, a muitas bactérias e a alguns parasitas.

O **vírus *influenza* A** liga-se a moléculas receptoras de glicoproteína da superfície celular contendo NeuAc, por meio de uma proteína denominada **hemaglutinina** (**H**). Esse vírus também possui uma **neuraminidase** (**N**), que desempenha um papel essencial ao possibilitar a eluição da progênie recém-sintetizada das células infectadas. Se esse processo for inibido, a disseminação do vírus diminui acentuadamente. Atualmente, existem inibidores dessa enzima (p. ex., zanamivir, oseltamivir) para uso no tratamento de pacientes com *influenza*. Os vírus *influenza* são classificados de acordo com o tipo de hemaglutinina e de neuraminidase. Existem pelo menos 16 tipos de hemaglutininas e nove tipos de neuraminidases. Assim, o **vírus da *influenza* aviária** é classificado como **H5N1**. Existe grande interesse em saber como esse vírus se fixa às células humanas, tendo em vista a possibilidade de ocorrência de pandemia. Foi constatado que o vírus liga-se preferencialmente a glicanos que terminam com o dissacarídeo **galactose → α-2,3-NeuAc** (**Figura 47-18**). Entretanto, o glicano predominante que termina com dissacarídeo nas células do trato respiratório humano é **galactose → α-2,6-NeuAc**. Se houver uma mudança na estrutura da hemaglutinina viral (devido a uma mutação) que possibilite a sua ligação ao último dissacarídeo, isso pode aumentar acentuadamente a infectividade potencial do vírus, resultando, possivelmente, em consequências muito graves.

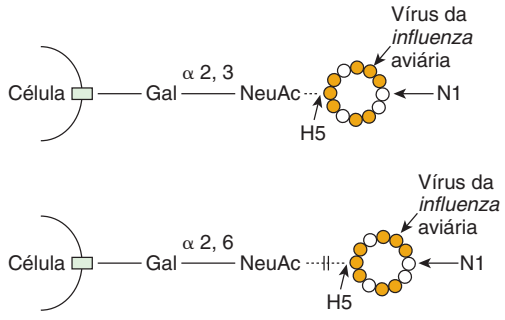


FIGURA 47-18 Representação esquemática da ligação do vírus da *influenza* aviária (H5N1) a uma célula epitelial respiratória. A hemaglutinina viral (HA) medeia a sua entrada nas células pela sua ligação a um glicano existente na superfície celular, que termina com o dissacarídeo galactose → α-2,3-NeuAc. Entretanto, não se liga a um glicano com terminação de galactose → α-2,6-NeuAc, que constitui o tipo predominantemente encontrado no trato respiratório humano. Se houver alteração da HA viral por meio de mutação, adquirindo a capacidade de se ligar a este último dissacarídeo, isso pode aumentar acentuadamente a sua patogenicidade nos seres humanos. (H5, hemaglutinina tipo 5; N1, neuraminidase tipo 1.)

O **vírus da imunodeficiência humana tipo 1** (**HIV-1**), que é considerado, pela maioria, como a causa da Aids, liga-se às células por uma de suas glicoproteínas de superfície (gp 120) e utiliza outra glicoproteína de superfície (gp 41) para fundir-se com a membrana da célula hospedeira. **Anticorpos** dirigidos contra a gp 120 desenvolvem-se durante a infecção pelo HIV-1, e tem havido interesse no uso dessa proteína como vacina. Um dos principais problemas com essa abordagem é o fato de que a estrutura da gp 120 pode ser alterada de modo relativamente rápido, devido a mutações, permitindo ao vírus escapar da atividade neutralizante dos anticorpos dirigidos contra ele.

Acredita-se que o *Helicobacter pylori* seja a principal causa das **úlceras pépticas**. Os estudos realizados demonstraram que essa bactéria liga-se a pelo menos dois glicanos diferentes que estão presentes na superfície das células epiteliais do estômago (ver **Figura 47-19**). Isso permite ao microrganismo estabelecer um local de fixação estável no revestimento do estômago, e acredita-se que a ulceração seja iniciada pela secreção subsequente de amônia e outras moléculas pela bactéria.

De modo semelhante, muitas **bactérias que provocam diarreia** também se fixam às células superficiais do intestino por meio de glicanos presentes nas glicoproteínas ou nos glicolipídeos.

A etiologia básica da **fibrose cística** (FC) consiste em mutações do gene que codifica o CFTR (ver Capítulos 40 e 57). Nessa doença, um problema importante consiste nas infecções pulmonares recidivas causadas por bactérias, como *Pseudomonas aeruginosa*. Na FC, ocorre desidratação relativa das secreções respiratórias em consequência de alterações da composição eletrolítica nas vias respiratórias, em decorrência de mutações do CFTR. Bactérias como a *P. aeruginosa* fixam-se às cadeias de açúcares das mucinas e encontram o ambiente desidratado nos bronquíolos, que constitui um local favorável para a sua multiplicação.

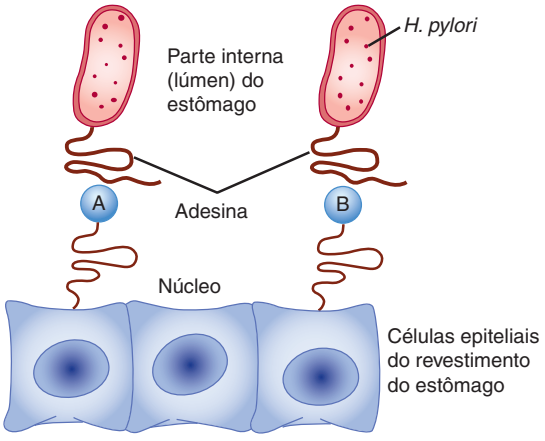


FIGURA 47-19 Fixação do *Helicobacter pylori* às células epiteliais do estômago. A adesina, proteína presente na cauda do *H. pylori*, interage com dois glicanos diferentes (estruturas mostradas na figura), presentes nas glicoproteínas da superfície das células epiteliais do estômago. Isso proporciona um local de fixação para a bactéria. Posteriormente, o microrganismo libera moléculas, como amônia, que contribuem para a iniciação do processo de ulceração péptica. (A) NeuAcα2,3,Galβ1,4 – Proteína (Neuraminilgalactose); (B) Fuca1,2Galβ1,3GlcNAc – Proteína (substância de LewisB).

A fixação do *Plasmodium falciparum* – um dos tipos de plasmódios que causam a malária – às células humanas é mediado por um GPI presente na superfície do parasito.

Vários pesquisadores estão **analisando as superfícies dos vírus,** das **bactérias,** dos **parasitas** e das **células humanas** para identificar quais as moléculas que estão envolvidas no processo de fixação. É importante definir a natureza precisa das interações entre os microrganismos invasores e as células hospedeiras, já que isso certamente levará ao desenvolvimento de fármacos ou a outros agentes capazes de inibir especificamente a fixação.

O RITMO DAS PESQUISAS EM GLICÔMICA ESTÁ SENDO ACELERADO

No passado, a pesquisa de glicoconjugados foi dificultada pela falta de disponibilidade de técnicas apropriadas para determinar as estruturas dos glicanos. Entretanto, hoje, estão disponíveis técnicas analíticas apropriadas (algumas das quais estão listadas na Tabela 47-3), assim como novas técnicas genéticas poderosas (p. ex., *knockouts* e *knockdowns* utilizando moléculas de RNAi). Não há dúvida de que as pesquisas em glicômica não apenas irão fornecer muitas informações estruturais sobre os glicoconjugados, ajudando a desvendar "o código de açúcares da vida", como também irão revelar muitas interações biológicas novas e importantes que dependem dos açúcares e irão possibilitar o desenvolvimento de fármacos e outras terapias.

RESUMO

- As glicoproteínas são proteínas de ampla distribuição – com diversas funções – que contêm uma ou mais cadeias de carboidratos com ligação covalente.
- Os componentes de carboidratos de uma glicoproteína variam de um a mais de 85% de seu peso, e podem ser simples ou muito complexos na sua estrutura. Oito açúcares são principalmente encontrados nas cadeias de açúcar das glicoproteínas humanas: a xilose, a fucose, a galactose, a glicose, a manose, a *N*-acetilgalactosamina, a *N*-acetilglicosamina e o ácido *N*-acetilneuramínico.
- Pelo menos algumas cadeias oligossacarídicas das glicoproteínas codificam informações biológicas; são também importantes nas glicoproteínas, já que modulam a sua solubilidade e viscosidade, protegendo-as contra a proteólise, bem como suas ações biológicas.
- As estruturas das cadeias de oligossacarídeos podem ser elucidadas por cromatografia líquido-gasosa, espectrometria de massa e espectrometria NMR de alta resolução.
- As glicosidases hidrolisam ligações específicas dos oligossacarídeos e são usadas para explorar tanto as estruturas quanto as funções das glicoproteínas.
- As lectinas são proteínas de ligação de carboidratos envolvidas na adesão celular e em muitos outros processos biológicos.
- As principais classes de glicoproteínas são as glicoproteínas *O*-ligadas (que envolvem um OH da serina ou da treonina), *N*-ligadas (que envolvem o *N* do grupo amida da asparagina) e GPI-ligadas.
- As mucinas constituem uma classe de glicoproteínas *O*-ligadas, estão distribuídas pelas superfícies das células epiteliais dos tratos respiratório, gastrintestinal e reprodutor.
- O retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi desempenham um importante papel nas reações de glicosilação envolvidas na biossíntese das glicoproteínas.
- As cadeias oligossacarídicas das glicoproteínas *O*-ligadas são sintetizadas pelo acréscimo sequencial de açúcares doados por açúcares nucleotídicos, em reações catalisadas por glicosiltransferases específicas de glicoproteínas individuais.
- Por outro lado, a síntese das glicoproteínas *N*-ligadas envolve um dolicol-P-P-oligossacarídeo específico e várias glicotransferases e glicosidases. Dependendo das enzimas e das proteínas precursores existentes em determinado tecido, ele pode sintetizar oligossacarídeos *N*-ligados dos tipos complexo, híbrido ou rico em manose.
- As glicoproteínas estão implicadas em muitos processos biológicos. Por exemplo, foi constatado que elas desempenham funções essenciais na fertilização e na inflamação.
- Foram identificadas diversas doenças que envolvem anormalidades na síntese e na degradação das glicoproteínas. As glicoproteínas também estão envolvidas em muitas outras doenças, incluindo *influenza*, Aids, artrite reumatoide, fibrose cística e úlcera péptica.
- Os avanços no novo campo da glicômica provavelmente irão fornecer novas informações sobre os papéis dos açúcares tanto na saúde quanto na doença e também irão indicar alvos para o desenvolvimento de fármacos e outros tipos de terapia.

REFERÊNCIAS

Chandrasekeran A, Srinivasan A, Raman R, et al: Glycan topology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin. Nat Biotechnology 2008;26:107.

Freeze HH: Congenital disorders of glycosylation: CDG-I, CDG-II, and beyond. Curr Mol Med 2007;7:389.

Kiessling LL, Splain RA: Chemical approaches to glycobiology. Annu Rev Biochem. 2010;79:619.

Kornfeld R, Kornfeld S: Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Annu Rev Biochem 1985;54:631.

Ohtsubo K, Marth JD: Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. Cell 2006;126:855.

Pilobelli KT, Mahal LK: Deciphering the glycocode: the complexity and analytical challenge of glycomics. Curr Opin Chem Biol 2007;11:300.

Ramasamy R, Yan SF, Herold K, et al: Receptor for advanced glycation end products: fundamental roles in the inflammatory response: winding the way to the pathogenesis of endothelial dysfunction and atherosclerosis. Ann NY Acad Sci 2008;1126:7.

Scriver CR, Beaudet AI, Sly WS, et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* 8th ed. McGraw-Hill, 2001. (Various chapters in this text and its updated online version [see References for Chapter 1] give in-depth coverage of topics such as I-cell disease and disorders of glycoprotein degradation.)

Taylor ME, Drickamer K: *Introduction to Glycobiology.* Oxford University Press, 2003.

Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al: *Essentials of Glycobiology.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008.

Von Itzstein M, Plebanski M, Cooke RM, Coppel RL: Hot, sweaty and sticky: the glycobiology of *Plasmodium falciparum.* Trends Parasitol 2008;24:210.

Werz DB, Seeberger PH: Carbohydrates are the next frontier in pharmaceutical research. Chemistry 2005;11:3194.

CAPÍTULO

48

A Matriz Extracelular

Robert K. Murray, M.D., Ph.D. e Frederick W. Keeley, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Reconhecer a importância da matriz extracelular (MEC) e seus componentes tanto na saúde quanto na doença.
- Descrever as propriedades estruturais e funcionais do colágeno e da elastina, as principais proteínas da MEC.
- Indicar as principais características da fibrilina, da fibronectina e da laminina, outras proteínas importantes da MEC.
- Referir as propriedades e as características da síntese e da degradação dos glicosaminoglicanos e dos proteoglicanos, bem como suas contribuições para a MEC.
- Descrever sucintamente as principais características bioquímicas do osso e da cartilagem.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

As células dos mamíferos estão, em sua maioria, localizadas em tecidos, onde ficam circundadas por uma MEC complexa, geralmente designada como "tecido conectivo". A MEC contém três classes principais de biomoléculas: (1) proteínas estruturais, como, por exemplo, o colágeno, a elastina e a fibrilina-1; (2) determinadas proteínas especializadas, como a fibronectina e a laminina; e (3) proteoglicanos, cuja natureza química é descrita adiante. Foi constatado que a MEC está envolvida em muitos processos normais e patológicos – por exemplo, ela desempenha funções importantes no desenvolvimento, nos estados inflamatórios e na disseminação das células neoplásicas. Foi documentada a participação de certos componentes da MEC tanto na artrite reumatoide quanto na osteoartrite. Várias doenças (p. ex., osteogênese imperfeita e alguns dos tipos da síndrome de Ehlers-Danlos) são causadas por distúrbios genéticos da síntese do colágeno. Os componentes específicos dos proteoglicanos (os glicosaminoglicanos; GAG) estão incluídos no grupo de distúrbios genéticos conhecidos como mucopolissacaridoses. Durante o processo de envelhecimento, ocorrem alterações da MEC. Este capítulo descreve a bioquímica básica das três principais classes de biomoléculas encontradas na MEC e ilustra a sua importância biomédica. Além disso, são também analisadas sucintamente as principais características bioquímicas de duas formas especializadas de MEC – o osso e a cartilagem –, bem como várias doenças que os acometem.

O COLÁGENO DO TIPO I É COMPOSTO POR UMA ESTRUTURA HELICOIDAL TRIPLA E FORMA FIBRILAS

O **colágeno**, que constitui o principal componente da maioria dos tecidos conectivos, representa aproximadamente 25% da proteína dos mamíferos. Proporciona uma estrutura extracelular para todos os animais metazoários e é encontrado em praticamente todos os tecidos animais. Nos tecidos humanos, foram identificados pelo menos 28 tipos distintos de colágeno, formados por mais de 30 cadeias polipeptídicas distintas (cada uma delas codificada por um gene distinto). Embora vários desses tipos de colágeno só estejam presentes em pequenas proporções, eles podem desempenhar um papel importante na determinação das propriedades físicas de tecidos específicos. Além disso, diversas proteínas (p. ex., o componente C1q do sistema complemento, as proteínas surfactantes pulmonares SPA e SPD), que não são classificadas como colágeno, apresentam em suas estruturas, domínios semelhantes ao colágeno; essas proteínas são algumas vezes designadas como "colágenos não colágenos".

A **Tabela 48-1** fornece um resumo de informações sobre muitos dos tipos de colágenos encontrados nos tecidos humanos; a nomenclatura empregada para designar os tipos de colágenos e seus genes é descrita no rodapé.

Na **Tabela 48-2**, os tipos de colágeno já listados na Tabela 48-1 são subdivididos em várias classes, principalmente com

TABELA 48-1 Tipos de colágeno e seus genes[1]

Tipo	Genes	Tecido
I	*COL1A1, COL1A2*	A maioria dos tecidos conectivos, inclusive o osso
II	*COL2A1*	Cartilagem, humor vítreo
III	*COL3A1*	Tecidos conectivos extensíveis, como a pele, os pulmões e o sistema vascular
IV	*COL4A1-COL4A6*	Membranas basais
V	*COL5A1-COL5A3*	Componente menor em tecidos que contêm colágeno I
VI	*COL6A1-COL6A3*	A maioria dos tecidos conectivos
VII	*COL7A1*	Fibrilas de ancoragem
VIII	*COL8A1-COL8A2*	Endotélio, outros tecidos
IX	*COL9A1-COL9A3*	Tecidos que contêm colágeno II
X	*COL10A1*	Cartilagem hipertrófica
XI	*COL11A1, COL11A2, COL2A1*	Tecidos que contêm colágeno II
XII	*COL12A1*	Tecidos que contêm colágeno I
XIII	*COL13A1*	Muitos tecidos
XIV	*COL14A1*	Tecidos que contêm colágeno I
XV	*COL15A1*	Muitos tecidos
XVI	*COL16A1*	Muitos tecidos
XVII	*COL17A1*	Hemidesmossomos da pele
XVIII	*COL18A1*	Muitos tecidos (p. ex., fígado, rim)
XIX	*COL19A1*	Células do rabdomiossarcoma

Fonte: Adaptada parcialmente de Prockop DJ, Kivirrikko KI: Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. Annu Rev Biochem 1995;64:403. Copyright © 1995 by Annual Reviews, www.annualreviews.org. Reimpressa com autorização.

[1]Os tipos de colágeno são designados por algarismos romanos. As cadeias de pró-colágeno constituintes, denominadas cadeias pró-α, são numeradas com algarismos arábicos, seguidos do tipo de colágeno entre parênteses. Por exemplo, o pró-colágeno tipo I é formado por duas cadeias pró-α(I) e uma cadeia pró-α2 (I). Trata-se, portanto, de um heterotrímero, enquanto o pró-colágeno do tipo 2 é formado por três cadeias de pró-α1 (II) e, portanto, é um homotrímero. Os genes do colágeno são designados de acordo com o tipo de colágeno, escrito em algarismos arábicos para o símbolo do gene, seguidos de uma letra A e do número da cadeia pró-α que ele codifica. Assim, os genes *COL1A1* e *COL1A2* codificam as cadeias α1 e α2 do colágeno do tipo I, respectivamente. Atualmente, já foram identificados pelo menos 28 tipos de colágeno.

base nas estruturas que eles formam. Neste capítulo, trataremos principalmente dos **colágenos I e II**, os quais formam fibrilas e que constituem os principais colágenos da pele e do osso e da cartilagem, respectivamente. Todavia, serão também mencionados alguns dos outros colágenos.

O COLÁGENO É A PROTEÍNA MAIS ABUNDANTE NO REINO ANIMAL

Todos os tipos de colágeno apresentam uma **estrutura helicoidal tripla**. Em alguns colágenos, toda a molécula forma uma tripla-hélice, ao passo que, em outros, a tripla-hélice pode constituir apenas uma parte da estrutura. O colágeno tipo I maduro, que contém cerca de 1.000 aminoácidos, pertence ao primeiro tipo; neste colágeno, cada subunidade polipeptídica ou cadeia alfa é torcida em uma hélice de poliprolina orientada para a esquerda de três resíduos por giro (**Figura 48-1**). Em seguida, três dessas cadeias alfa são torcidas em uma **super-hélice orientada para a**

TABELA 48-2 Classificação dos colágenos com base principalmente nas estruturas que eles formam

Classe	Tipo
Formação de fibrilas	I, II, III, V e XI
Semelhante a uma rede	IV, VIII, X
FACIT[1]	IX, XII, XIV, XVI, XIX
Filamentos em esferas	VI
Fibrilas de ancoragem	VII
Domínio transmembrana	XIII, XVII
Outras	XV, XVIII

Fonte: Com base em Prockop DJ, Kivirrikko KI: Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. Annu Rev Biochem 1995;64:403. Copyright © 1995 by Annual Reviews. Reimpressa com autorização.

[1]FACIT = colágenos associados a fibrilas, com tripla-hélices interrompidas. Foram identificados outros colágenos além daqueles listados acima.

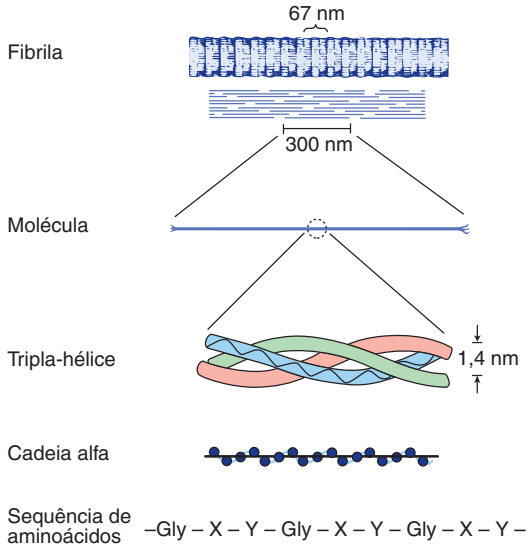


FIGURA 48-1 Características moleculares da estrutura do colágeno, desde a sequência primária até a fibrila. Cada cadeia polipeptídica individual é torcida em uma hélice orientada para a esquerda de três resíduos (Gly-X-Y) por giro, e todas essas cadeias são entrelaçadas em uma super-hélice orientada para a direita. (Ligeiramente modificada e reproduzida, com autorização, de Eyre DR: Collagen (1980), "Molecular diversity in the body's protein scaffold". Science 207:1315. Reimpressa com autorização da AAAS.)

direita, formando uma molécula semelhante a um bastão com 1,4 nm de diâmetro e cerca de 300 nm de comprimento. Uma notável característica do colágeno é a presença de resíduos de **glicina** a cada terceira posição da porção helicoidal tripla da cadeia alfa. Essa glicina é necessária, já que ela é o único aminoácido pequeno o suficiente para se acomodar no espaço limitado disponível dentro do cerne central da tripla-hélice. Essa **estrutura repetida,** representada como $(Gly\text{-}X\text{-}Y)_n$, é um pré-requisito absoluto para a formação da tripla-hélice. Embora X e Y possam ser quaisquer outros aminoácidos, cerca de 100 das posições X consistem em prolina, e cerca de 100 das posições Y consistem em hidroxiprolina. A prolina e a hidroxiprolina conferem **rigidez** à molécula do colágeno. A **hidroxiprolina** é formada pela hidroxilação pós-tradução de resíduos de prolina ligados a peptídeos, em uma reação catalisada pela enzima **prolil-hidroxilase**, cujos cofatores são o **ácido ascórbico** (vitamina C) e o α-cetoglutarato. As moléculas de lisina na posição Y também podem ser modificadas após tradução em hidroxiprolina pela ação da **lisil hidroxilase**, uma enzima que utiliza cofatores semelhantes. Algumas dessas moléculas de hidroxilisina podem ser ainda modificadas pelo acréscimo de galactose ou de galactosil-glicose por uma **ligação *O*-glicosídica** (**ver Capítulo 47**), um local de glicosilação que é exclusivo do colágeno.

Os tipos de colágeno que formam fibras longas semelhantes a bastões nos tecidos são montados pela associação lateral dessas unidades helicoidais triplas em um **alinhamento** "**escalonado de um quarto**", de tal modo que cada uma é deslocada longitudinalmente da fibra vizinha por uma distância de ligeiramente menos de um quarto de seu comprimento (Figura 48-1, parte superior). Essa disposição é responsável pela aparência em faixas dessas fibras nos tecidos conectivos. As fibras de colágeno são ainda estabilizadas pela formação de **ligações cruzadas covalentes**, tanto dentro quanto entre as unidades helicoidais triplas. Essas ligações cruzadas formam-se pela ação da **lisil oxidase**, uma enzima dependente de cobre que desamina oxidativamente os grupos ε-amino de certos resíduos de lisina e hidroxilisina, produzindo aldeídos reativos. Esses aldeídos podem formar produtos de condensação aldóis com outros aldeídos derivados da lisina ou da hidroxilisina, ou podem formar bases de Schiff com os grupos ε-amino das lisinas ou hidroxilisinas não oxidadas. Essas reações, após rearranjos químicos adicionais, resultam nas ligações cruzadas covalentes estáveis, que são importantes para a força de tensão das fibras. A histidina também pode estar envolvida em determinadas ligações cruzadas.

Vários tipos de colágeno não formam fibrilas nos tecidos (Tabela 48-2). Caracterizam-se por interrupções da tripla-hélice, com extensões das proteínas que carecem as sequências repetidas de Gly-X-Y. Essas sequências sem Gly-X-Y resultam em áreas de estrutura globular intercaladas na estrutura helicoidal tripla.

O **colágeno tipo IV**, o exemplo mais bem caracterizado de um colágeno com hélices triplas descontínuas, constitui um importante componente das **membranas basais**, onde forma uma rede semelhante a uma malha.

O colágeno sofre modificações pós-traducionais extensas

O colágeno recém-sintetizado sofre extensa **modificação pós-tradução** antes de fazer parte de uma fibra de colágeno extracelular madura (**Tabela 48-3**). À semelhança da maioria das proteínas secretadas, o colágeno é sintetizado nos ribossomos em uma forma precursora, o **pré-pró-colágeno**, que contém uma sequência líder ou sinal, que direciona a cadeia polipeptídica para o lúmen do retículo endoplasmático. Quando entra no retículo endoplasmático, essa sequência líder é removida enzimaticamente. A **hidroxilação** dos resíduos de prolina e de lisina e a **glicosilação** das hidroxilisinas na molécula do **pró-colágeno** também ocorrem nessa organe-

TABELA 48-3 Sequência e localização do processamento do precursor do colágeno fibrilar

Intracelular
1. Clivagem do peptídeo sinal
2. Hidroxilação dos resíduos prolil e de alguns resíduos lisil; glicosilação de alguns resíduos hidroxilisil
3. Formação de pontes S–S entre e dentro das cadeias dos peptídeos em extensão
4. Formação da tripla-hélice
Extracelular
1. Clivagem dos pró-peptídeos aminoterminal e carboxiterminal
2. Montagem das fibras de colágeno em alinhamento escalado de um quarto
3. Desaminação oxidativa dos grupos ε-amino dos resíduos lisil e hidroxilisil em aldeídos
4. Formação de ligações cruzadas entre e dentro das cadeias por bases de Schiff e produtos de condensação aldóis

la. A molécula de pró-colágeno contém extensões polipeptídicas (**peptídeos de extensão**) de 20 a 35 kDa em ambas as extremidades aminoterminal e carboxiterminal, nenhuma das quais está presente no colágeno maduro. Ambos os peptídeos de extensão contêm resíduos de cisteína. Enquanto o pró-peptídeo aminoterminal forma apenas pontes de dissulfeto dentro das cadeias, os pró-peptídeos carboxiterminal estabelecem pontes dissulfeto dentro das cadeias, bem como entre elas. A formação dessas pontes dissulfeto ajuda no **registro** das três moléculas de colágeno para formar a tripla-hélice, cuja torção começa na extremidade carboxiterminal. Após a formação da tripla-hélice não pode ocorrer mais nenhuma hidroxilação adicional da prolina ou da lisina, nem glicosilação das hidroxilisinas. A **automontagem** é um princípio fundamental na biossíntese do colágeno.

Após **secreção** da célula pelo aparelho de Golgi, as enzimas extracelulares, denominadas **pró-colágeno aminoproteinase** e **pró-colágeno carboxiproteinase**, removem os peptídeos de extensão nas extremidades aminoterminal e carboxiterminal, respectivamente. A clivagem desses pró-peptídeos pode ocorrer dentro das criptas ou das dobras na membrana celular. Uma vez removidos os pró-peptídeos, as moléculas de colágeno de tripla-hélice, contendo aproximadamente 1.000 aminoácidos por cadeia, sofrem **montagem espontânea** em fibras de colágeno. Essas fibras são ainda mais estabilizadas pela formação de **ligações cruzadas entre as cadeias e dentro das cadeias**, por meio da ação da lisil-oxidase, conforme descrito anteriormente.

As mesmas células que secretam colágeno também secretam a **fibronectina**, uma glicoproteína grande encontrada nas superfícies celulares, na matriz extracelular e no sangue (ver adiante). A fibronectina liga-se às fibras de pré-colágeno em agregação e altera a cinética de formação das fibras na matriz pericelular. Em associação à fibronectina e ao pró-colágeno nessa matriz, encontram-se os **proteoglicanos** conhecidos como heparan sulfato e condroitina sulfato (ver adiante). Com efeito, o **colágeno tipo IX**, um tipo de colágeno de menor importância da cartilagem, contém uma cadeia de glicosaminoglicano ligada. Essas interações podem servir para regular a formação das fibras de colágeno e determinar a sua orientação nos tecidos.

Uma vez formado, o colágeno apresenta uma **estabilidade metabólica** relativa. Entretanto, a sua decomposição é acelerada durante a inanição e em vários estados inflamatórios. Ocorre produção excessiva de colágeno em algumas condições, como, por exemplo, a cirrose hepática.

Diversas doenças genéticas resultam de anormalidades na síntese do colágeno

Cerca de 30 genes codificam os colágenos, e a sua via de biossíntese é complexa, envolvendo, no mínimo, oito etapas pós-tradução catalisadas por enzimas. Portanto, não é surpreendente que diversas doenças (**Tabela 48-4**) sejam causadas por **mutações dos genes do colágeno** ou dos **genes que codificam algumas das enzimas** envolvidas nessas modificações pós-tradução. As doenças que acometem os ossos (p. ex., osteogênese imperfeita) e a cartilagem (p. ex., condrodisplasias) são discutidas posteriormente neste capítulo.

A **síndrome de Ehlers-Danlos** compreende um grupo de distúrbios hereditários, cujas principais manifestações clínicas consistem em hiperextensibilidade da pele, fragilidade anormal dos tecidos e aumento da mobilidade das articulações. O quadro clínico é variável, refletindo a extensa heterogeneidade genética subjacente. Foram reconhecidos pelo menos 10 tipos, dos quais a maioria reflete uma variedade de lesões na síntese do colágeno. O **tipo IV** é o mais grave, em virtude de sua tendência à ruptura espontânea das artérias no intestino, refletindo anormalidades do colágeno tipo III. Os pacientes acometidos pelo **tipo VI,** causado por uma deficiência de lisil-hidroxilase, apresentam hipermobilidade articular pronunciada e tendência à ruptura ocular. A deficiência de pró-colágeno *N*-proteinase, que leva à formação de fibrilas de colágeno finas, irregulares e anormais, é responsável pelo **tipo VIIC**, que se manifesta por acentuada hipermobilidade das articulações e flacidez da pele.

A **síndrome de Alport** é o termo utilizado para descrever diversos distúrbios genéticos (tanto ligados ao X quanto autossômicos) que acometem a estrutura das fibras de colágeno **tipo IV**, o principal colágeno encontrado nas membranas basais dos glomérulos renais (ver discussão da laminina, adiante). Foram demonstradas mutações em vários genes que codificam as fibras de colágeno tipo IV. O sinal inicial consiste em hematúria, e os pacientes eventualmente podem desenvolver doença renal terminal. A microscopia eletrônica revela anormalidades características da estrutura da membrana basal e da lâmina densa.

TABELA 48-4 Doenças causadas por mutações dos genes do colágeno ou por deficiências das atividades das enzimas pós-tradução envolvidas na biossíntese do colágeno

Gene ou enzima	Doença[1]
COL1A1, COL1A2	Osteogênese imperfeita, tipo 1[2] (OMIM 166200) Osteoporose[3] (OMIM 166710) Síndrome de Ehlers-Danlos tipo VII autossômica dominante (OMIM 130060)
COL2A1	Condrodisplasias severas Osteoartrite[3] (OMIM 165720)
COL3A1	Síndrome de Ehlers-Danlos tipo IV (OMIM 130050)
COL4A3, COL4A6	Síndrome de Alport (incluindo formas tanto autossômicas quanto ligadas ao X) (OMIM 104200)
COL7A1	Epidermólise bolhosa distrófica (OMIM 131750)
COL10A1	Condrodisplasia metafisária de Schmid (OMIM 156500)
Lisil hidroxilase	Síndrome de Ehlers-Danlos tipo VI (OMIM 225400)
Pró-colágeno *N*-proteinase	Síndrome de Ehlers-Danlos tipo VII autossômica recessiva (OMIM 225410)
Lisil hidroxilase	Doença de Menkes[4] (OMIM 309400)

Fonte: Adaptada de Prockop DJ, Kivirrikko KI. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. Annu Rev Biochem 1995;64:403. Copyright © 1995 by Annual Reviews. Reimpressa com autorização.
[1]Foi demonstrada uma ligação genética com os genes do colágeno em alguns outros distúrbios que não estão listados nesta Tabela.
[2]Foram descritos, no mínimo, quatro tipos de osteogênese imperfeita; a grande maioria das mutações em todos os tipos envolve os genes *COL1A1* e *COL1A2*.
[3]Atualmente, aplica-se apenas a um número relativamente pequeno desses pacientes.
[4]Secundária a uma deficiência de cobre (Capítulo 50).

Na **epidermólise bolhosa**, a pele sofre ruptura e forma bolhas em consequência de traumatismo menor. A forma distrófica é causada por mutações do gene *COL7A1,* que afetam a estrutura do colágeno **tipo VII**. Esse colágeno forma delicadas fibrilas que ancoram a lâmina basal às fibrilas de colágeno na derme. Foi constatado que essas fibrilas de ancoragem estão acentuadamente reduzidas nessa forma da doença, levando, provavelmente, à formação de bolhas. A epidermólise bolhosa simples, outra variante, é causada por mutações da ceratina 5 (Capítulo 49).

O **escorbuto** afeta a estrutura do colágeno. Entretanto, é causado por uma **deficiência de ácido ascórbico** (Capítulo 44) e não é uma doença genética. Os principais sinais consistem em hemorragias gengivais e subcutâneas e cicatrização deficiente de feridas. Esses sinais refletem o comprometimento da síntese de colágeno, devido a **deficiências de prolil-hidroxilase e lisil-hidroxilase,** ambas as quais necessitam de ácido ascórbico como cofator.

Na **doença de Menkes**, a deficiência de cobre resulta em ligação cruzada deficiente do colágeno e da elastina pela enzima dependente de cobre, a lisil-oxidase. (A doença de Menkes é discutida no Capítulo 50.)

A ELASTINA CONFERE EXTENSIBILIDADE E RETRATILIDADE AOS PULMÕES, AOS VASOS SANGUÍNEOS E AOS LIGAMENTOS

A **elastina** é uma proteína do tecido conectivo responsável pelas propriedades de extensibilidade e retração elástica dos tecidos. Embora não seja tão conhecida quanto o colágeno, a elastina está presente em grandes quantidades, particularmente nos tecidos que necessitam dessas propriedades físicas, como, por exemplo, os pulmões, as artérias de grande calibre e alguns ligamentos elásticos. Quantidades menores de elastina também são encontradas na pele, na cartilagem da orelha e em vários outros tecidos. Diferentemente do colágeno, parece haver apenas um tipo genético de elastina, embora surjam variantes por *splicing* alternativo (Capítulo 36) do hnRNA da elastina. A elastina é sintetizada sob a forma de um monômero solúvel de ~70 kDa, denominado **tropoelastina**. Algumas das prolinas da tropoelastina são hidroxiladas em **hidroxiprolina** pela prolil-hidroxilase, embora a hidroxilisina e a hidroxilisina glicosilada não estejam presentes. Diferentemente do colágeno, a tropoelastina não é sintetizada em uma pró-forma com peptídeos de extensão. Além disso, a elastina não contém sequências repetidas de Gly-X-Y, nem estrutura helicoidal tripla ou frações de carboidrato.

Após secreção da célula, certos resíduos lisil da tropoelastina sofrem desaminação oxidativa em aldeídos pela **lisil-oxidase,** a mesma enzima envolvida nesse processo com o colágeno. Entretanto, as principais ligações cruzadas formadas na elastina são as **desmosinas**, resultantes da condensação de três desses aldeídos derivados da lisina com uma lisina não modificada, formando uma ligação cruzada tetrafuncional característica da elastina. A elastina, em sua forma extracelular madura com ligações cruzadas, é altamente insolúvel e **extremamente estável** e apresenta uma taxa de renovação muito lenta. A elastina exibe uma variedade de conformações helicoidais aleatórias que possibilitam o estiramento da proteína e a sua retração subsequente durante o desempenho de suas funções fisiológicas.

A **Tabela 48-5** fornece um resumo das principais diferenças entre o colágeno e a elastina.

Foram encontradas deleções do gene da elastina (localizado em 7q11.23) em cerca de 90% dos indivíduos com **síndrome de Williams-Beuren** (OMIM 194050), um distúrbio de desenvolvimento que acomete o tecido conectivo e o sistema nervoso central. As mutações, que afetam a síntese de elastina, provavelmente desempenham um papel etiológico na **estenose aórtica supravalvar** que ocorre com frequência nessa doença. A fragmentação ou, alternativamente, a redução da elastina são observadas em distúrbios como o enfisema pulmonar, a cútis flácida e o envelhecimento da pele.

A SÍNDROME DE MARFAN É CAUSADA POR MUTAÇÕES DO GENE DA FIBRILINA-1, UMA PROTEÍNA PRESENTE NAS MICROFIBRILAS

A **síndrome de Marfan** é uma doença hereditária relativamente prevalente que acomete o tecido conectivo. É herdada como caráter autossômico dominante. A doença acomete os **olhos** (p. ex., causando luxação da lente, conhecida como *ectopia lentis*), o **sistema esquelético** (a maioria dos pacientes tem estatura alta e apresenta dedos longos [aracnodactilia] e hiperextensibilidade das articulações) e o **sistema cardiovascular** (p. ex., causando enfraquecimento da túnica média da aorta, com consequente dilatação da aorta ascendente). É possível que Abraham Lincoln tenha tido essa doença. Os casos são devidos, em sua maioria, a mutações do gene (localizado no cromossomo 15) da **fibrilina-1**; foram detectadas mutações de sentido incorreto em vários pacientes com síndrome de Marfan. Essas mutações resultam em fi-

TABELA 48-5 Principais diferenças entre o colágeno e a elastina

Colágeno	Elastina
1. Muitos tipos genéticos diferentes	Um tipo genético
2. Tripla-hélice	Ausência de tripla-hélice; conformações helicoidais aleatórias possibilitando o seu estiramento
3. Estrutura repetitiva $(Gly\text{-}X\text{-}Y)_n$	Ausência de estrutura repetitiva $(Gly\text{-}X\text{-}Y)_n$
4. Presença de hidroxilisina	Ausência de hidroxilisina
5. Contêm carboidratos	Não contêm carboidratos
6. Ligações cruzadas de aldol intramoleculares	Ligações cruzadas de desmosina intramoleculares
7. Presença de peptídeos de extensão durante a biossíntese	Ausência de peptídeos de extensão durante a biossíntese

brilina anormal e/ou quantidades menores depositadas na MEC. Há evidências de que a citocina **TGF-β** se liga normalmente à fibrilina-1; se essa ligação estiver diminuída (pelas menores quantidades de fibrilina-1), pode acarretar um excesso da citocina. O TGF-β em excesso pode contribuir para a patologia (p. ex., na aorta e válvula aórtica) observada nessa síndrome. Esse achado pode levar ao desenvolvimento de terapias para o distúrbio, utilizando fármacos que antagonizam o TGF-β (p. ex., Losartana).

A **fibrilina-1** é uma grande glicoproteína (cerca de 350 kDa), que constitui um componente estrutural de microfibrilas ou fibras de 10 a 12 nm encontradas em muitos tecidos. É secretada (após clivagem proteolítica) na MEC pelos fibroblastos e é incorporada às **microfibrilas** insolúveis, as quais parecem fornecer um esqueleto para o depósito de elastina. Um aspecto particularmente relevante na síndrome de Marfan consiste na presença de fibrilina-1 nas fibras zonulares da **lente do olho**, no **periósteo** e em associação com fibras de elastina na **aorta** (e em outras regiões); essas localizações explicam, respectivamente, a *ectopia lentis*, a aracnodactilia e os problemas cardiovasculares encontrados nessa síndrome. Outras proteínas (p. ex., a emelina e duas proteínas associadas às microfibrilas) também são encontradas nas microfibrilas. É provável que a ocorrência de anormalidades nesses componentes possa causar outros distúrbios do tecido conectivo. Há outro gene para outra fibrilina – a **fibrilina-2** – no cromossomo 5; a ocorrência de mutações desse gene está associada à etiologia da **aracnodactilia contratural congênita** (OMIM 121050), mas não à síndrome de Marfan. A fibrilina-2 pode ser importante no depósito de microfibrilas no início do desenvolvimento. A **Figura 48-2** fornece um resumo da provável sequência de eventos que levam à síndrome de Marfan.

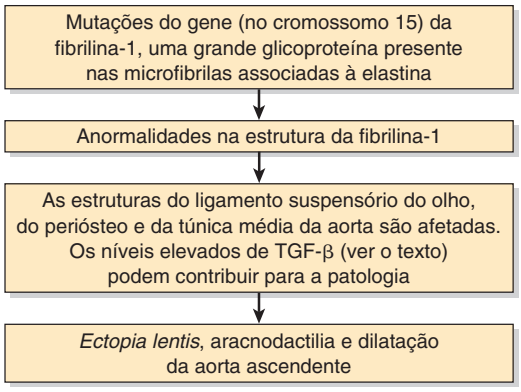


FIGURA 48-2 Provável sequência de eventos na etiologia dos principais sinais apresentados por pacientes com síndrome de Marfan (OMIM 154700).

A FIBRONECTINA É UMA IMPORTANTE GLICOPROTEÍNA ENVOLVIDA NA ADESÃO E MIGRAÇÃO CELULARES

A fibronectina é uma importante glicoproteína da matriz extracelular, e também é encontrada, em uma forma solúvel, no plasma. Consiste em duas subunidades idênticas, cada uma com cerca de 230 kDa, unidas por duas pontes dissulfeto próximo às regiões carboxiterminais. O gene que codifica a fibronectina é muito grande, contendo cerca de 50 éxons; o RNA produzido pela sua transcrição está sujeito a *splicing* alternativo considerável, e foram detectados até 20 mRNA diferentes em vários tecidos. A fibronectina contém três tipos de motivos repetidos (I, II e III) que estão organizados em **domínios** funcionais (pelo menos sete); as funções desses domínios incluem a ligação à **heparina** (ver adiante) e fibrina, ao colágeno, ao DNA e às superfícies celulares (Figura 48-3). A sequência de aminoácidos do receptor de fibronectina dos fibroblastos foi definida, e a proteína é um membro da classe de proteínas das integrinas transmembrana (Capítulo 51). As **integrinas** são heterodímeros que contêm vários tipos de cadeias α e β polipeptídicas. A fibronectina possui uma sequência Arg-Gly-Asp (RGD) que se liga ao receptor. A **sequência RGD** é compartilhada por várias outras proteínas presentes na MEC, as quais se ligam às integrinas presentes nas superfícies celulares. Os peptídeos sintéticos que contêm a sequência RGD inibem a ligação da fibronectina às superfícies celulares. A **Figura 48-4** ilustra a interação do colágeno, da fibronectina e da laminina – todas proteínas importantes da MEC, com uma célula típica (p. ex.: fibroblasto) presente na matriz.

O receptor de fibronectina interage indiretamente com os microfilamentos de **actina** (Capítulo 49) presentes no citosol (**Figura 48-5**). Diversas proteínas, conhecidas coletivamente como **proteínas de fixação**, estão envolvidas, incluindo a talina, a vinculina, uma proteína de revestimento do filamento de actina, e a α-actina. A talina interage com o receptor e a vinculina, enquanto as últimas duas interagem com a actina. A interação da fibronectina com o seu receptor assegura uma via pela qual o **exterior da célula pode comunicar-se com o interior** e, portanto, influenciar o comportamento celular. Por meio da interação com o seu receptor celular, a fibronectina desempenha um importante

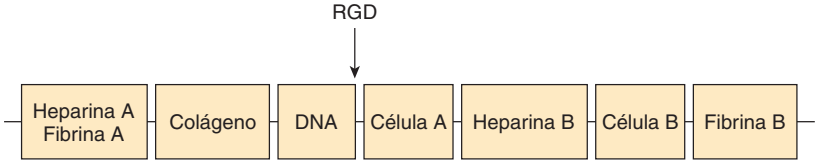


FIGURA 48-3 Representação esquemática da fibronectina. Os sete domínios funcionais da fibronectina estão representados, bem como dois tipos diferentes de domínio para a heparina, a ligação celular e a fibrina. Os domínios são constituídos de várias combinações de três motivos estruturais (I, II e III) que não estão ilustrados na figura. A figura também não mostra o fato de que a fibronectina é um dímero ligado por pontes dissulfeto situadas próximo às extremidades carboxiterminais dos monômeros. A localização aproximada da sequência RGD da fibronectina, que interage com uma variedade de receptores de integrina e fibronectina nas superfícies celulares, está indicada pela seta. (Redesenhada de Yamada KM: Adhesive recognition sequences. J Biol Chem 1991;266:12809.)

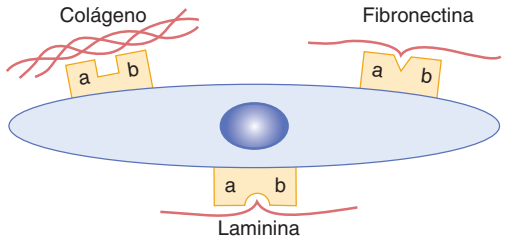


FIGURA 48-4 Representação esquemática de uma célula interagindo por meio de vários receptores de integrina com o colágeno, a fibronectina e a laminina presentes na MEC. (As subunidades específicas não estão indicadas.) (Redesenhada de de Yamada KM: Adhesive recognition sequences. J Biol Chem 1991;266:12809.)

papel na **adesão** das células à MEC. Além disso, está envolvida na **migração celular**, uma vez que fornece um local de ligação para as células, ajudando-as, assim, a percorrer o seu trajeto pela MEC. A quantidade de fibronectina ao redor de muitas células transformadas está acentuadamente reduzida, explicando, em parte, a sua interação defeituosa com a MEC.

A LAMININA É UM IMPORTANTE COMPONENTE PROTEICO DAS LÂMINAS BASAIS DOS GLOMÉRULOS RENAIS E DE OUTRAS LÂMINAS BASAIS

As lâminas basais são áreas especializadas da MEC que circundam as células epiteliais e algumas outras células (p. ex., células musculares); nesta seção, serão discutidas apenas as lâminas encontradas no glomérulo renal. Nessa estrutura, a lâmina basal é formada por duas camadas distintas de células (uma endotelial e outra epitelial), cada uma disposta em lados opostos da lâmina; essas três camadas constituem a membrana glomerular. Os principais componentes da lâmina basal consistem em três proteínas – laminina, entactina e colágeno tipo IV – e em heparina GAG ou heparan sulfato. Esses componentes são sintetizados pelas células subjacentes. O colágeno tipo IV foi descrito anteriormente.

A **laminina** (glicoproteína de cerca de 850 kDa e 70 nm de comprimento) consiste em três cadeias polipeptídicas alongadas distintas (cadeias α, β e γ) ligadas entre si para formar uma estrutura alongada complexa (ver Figura 49-11, **em que a laminina é denominada merosina**). Existem várias variantes genéticas da laminina, cujos detalhes não são apresentados aqui. A laminina possui sítios de ligação potenciais para o colágeno tipo IV, a heparina e integrinas nas superfícies celulares. O colágeno interage com a laminina (e não diretamente com a superfície celular), que, por sua vez, interage com integrinas ou outras proteínas receptoras de laminina, ancorando, assim, a lâmina às células. A **entactina**, também conhecida como "nidogênio", é uma glicoproteína que contém uma sequência RGD; liga-se à laminina e constitui um importante fator de fixação celular. A lâmina basal relativamente espessa do glomérulo renal desempenha um importante papel na **filtração glomerular**, regulando a passagem de grandes moléculas (em sua maior parte, proteínas plasmáticas) através do glomérulo para os túbulos renais. A membrana glomerular permite a passagem de

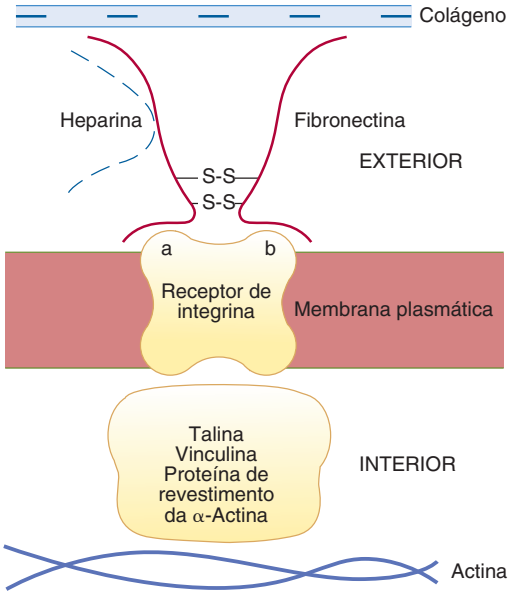


FIGURA 48-5 Representação esquemática da fibronectina interagindo com um receptor de integrina fibronectina, localizado na parte externa da membrana plasmática de uma célula da MEC e de várias proteínas de fixação interagindo direta ou indiretamente com um microfilamento de actina no citosol. Para simplificar, as proteínas de fixação estão representadas na forma de um complexo.

pequenas moléculas, como a **inulina** (5,2 kDa), tão facilmente quanto a água. Por outro lado, apenas uma pequena quantidade de **albumina** (69 kDa), a principal proteína plasmática, atravessa o glomérulo normal. Isso é explicado por dois conjuntos de fatos. (1) Os **poros** na membrana glomerular são grandes o suficiente para possibilitar a passagem de moléculas de até cerca de 8 nm. (2) A albumina é menor do que o diâmetro desse poro, porém é impedida de passar facilmente em virtude das **cargas negativas** do heparan sulfato e de algumas glicoproteínas que contêm ácido siálico na lâmina. Essas cargas negativas repelem a albumina e a maioria das proteínas plasmáticas que apresentam cargas negativas no pH do sangue. A estrutura normal do glomérulo pode ser gravemente danificada em determinados tipos de **glomerulonefrite** (p. ex., causada por anticorpos dirigidos contra vários componentes da membrana glomerular). Isso altera os poros, bem como as quantidades e disposições das macromoléculas de carga negativa citadas anteriormente, e quantidades relativamente maciças de albumina (e de algumas outras proteínas plasmáticas) podem ser eliminadas na urina, resultando em **albuminúria** severa.

PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS

Os glicosaminoglicanos encontrados nos proteoglicanos são formados por dissacarídeos repetidos

Os **proteoglicanos** são proteínas que contêm glicosaminoglicanos ligados de modo covalente. Pelo menos 30 proteoglicanos

foram caracterizados e receberam nomes como sindecano, betaglicano, serglicina, perlecano, agrecano, versicano, decorina, biglicano e fibromodulina. Variam quanto à sua distribuição nos tecidos, natureza da proteína do cerne, glicosaminoglicanos fixados e função. As proteínas ligadas de modo covalente aos glicosaminoglicanos são denominadas "**proteínas centrais**", cujo isolamento e caracterização têm sido difíceis; todavia, o uso da tecnologia do DNA recombinante está começando a fornecer informações importantes acerca de suas estruturas. A quantidade de **carboidrato** de um proteoglicano é geralmente muito maior do que a encontrada em uma glicoproteína e pode representar até 95% do seu peso. As **Figuras 48-6** e **48-7** mostram a estrutura geral de um proteoglicano específico, o **agrecano**, o principal tipo encontrado na cartilagem. O agrecano é muito grande (cerca de 2×10^3 kDa), e a sua estrutura global assemelha-se a uma escova. Contém um longo filamento de ácido hialurônico (um tipo de GAG), ao qual as proteínas estão fixadas por **ligações não covalentes**. Por sua vez, essas proteínas interagem de modo não covalente com moléculas de proteínas centrais, a partir das quais se projetam cadeias de outros GAG (queratan sulfato e condroitina sulfato, nesse caso). Na seção sobre cartilagem, adiante, são fornecidos mais detalhes acerca dessa macromolécula.

Existem pelo menos sete glicosaminoglicanos (GAG): o ácido hialurônico, o condroitina sulfato, os queratan sulfato I e II, a heparina, o heparan sulfato e o dermatan sulfato. O GAG é um polissacarídeo não ramificado formado por dissacarídeos repetidos,

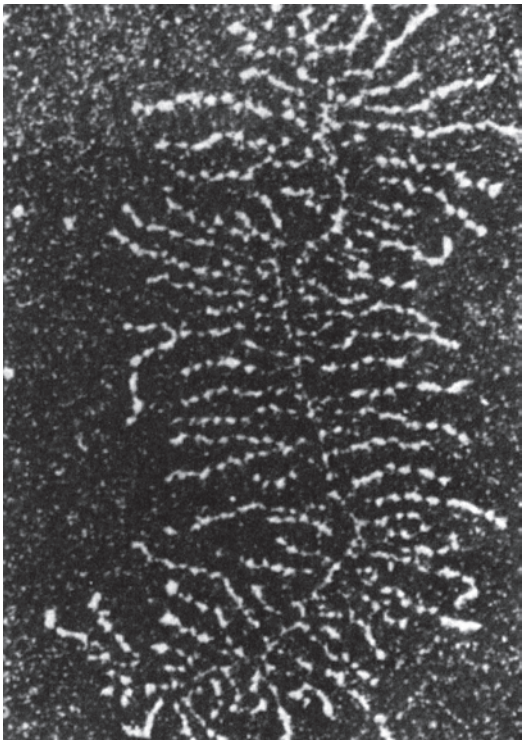


FIGURA 48-6 Micrografia eletrônica em campo escuro de um agregado de proteoglicanos, em que as subunidades de proteoglicanos e a estrutura filamentosa estão particularmente bem estendidas. (Reproduzida, com autorização de Rosenberg L, Hellman W, Kleinschmidt AK: Electron microscopic studies of proteoglycan aggregates from bovine articular cartilage. J Biol Chem 1975;250:1877.)

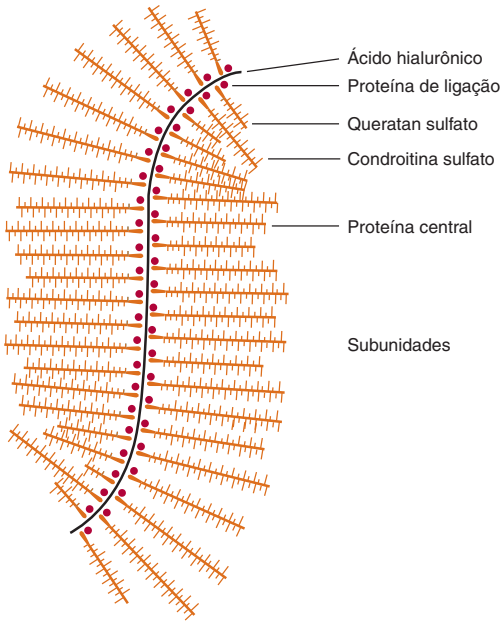


FIGURA 48-7 Representação esquemática do proteoglicano agrecano. (Reproduzida, com autorização, de Lennarz WJ: *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans.* Plenum Press, 1980. Reproduzida com autorização da Springer Science and Business Media.)

entre os quais um componente é sempre um aminoaçúcar (daí o nome GAG), a D-glicosamina ou a D-galactosamina. O outro componente do dissacarídeo repetido (exceto no caso do queratan sulfato) é um ácido urônico, o ácido L-glicurônico (GlcUA) ou seu epímero 5′, o ácido L-idurônico (IdUA). Com exceção do ácido hialurônico, todos os GAG contêm grupos sulfato, na forma de O--ésteres ou N-sulfato (na heparina e no heparan sulfato). O ácido hialurônico constitui outra exceção, já que não há evidências bem definidas de que esteja ligado de modo covalente a uma proteína, de acordo com a definição de um proteoglicano apresentada anteriormente. Tanto os GAG quanto os proteoglicanos têm sido difíceis de ser estudados, em parte devido à sua complexidade. Todavia, constituem componentes importantes da MEC; desempenham vários papéis biológicos importantes e estão envolvidos em diversos processos patológicos – razão pela qual o interesse por eles está aumentando rapidamente.

A biossíntese dos glicosaminoglicanos envolve a fixação às proteínas centrais, o alongamento da cadeia e a terminação da cadeia

Fixação às proteínas centrais

Em geral, a ligação entre os GAG e suas proteínas centrais pode ser de três tipos.

1. Uma **ligação *O*-glicosídica** entre a **xilose** (Xyl) e a **Ser**, uma ligação exclusiva dos proteoglicanos. Essa ligação é formada pela transferência de um resíduo Xyl para a Ser da UDP-xilose. Em seguida, são acrescentados dois resíduos de Gal ao resíduo de Xyl, formando um **trissacarídeo de ligação**, Gal--Gal-Xyl-Ser. O crescimento subsequente da cadeia do GAG ocorre na Gal terminal.

2. Uma **ligação *O*-glicosídica** é formada entre a **GalNAc** (N--acetilgalactosamina) e a **Ser** (**Thr**) (Figura 47-1A), presente no queratan sulfato II. Essa ligação é formada pela doação de um resíduo de GalNAc à Ser (ou Thr), utilizando UDP--GalNAc como doador.
3. Uma **ligação *N*-glicosilamina** entre a **GlcNAc** (*N*-acetil-glicosamina) e o nitrogênio amida da **Asn**, conforme observado nas glicoproteínas *N*-ligadas (Figura 47-1B). Acredita-se que a sua síntese envolva o dolicol-P-P-oligossacarídeo.

A síntese das proteínas centrais ocorre no **retículo endoplasmático**, onde também ocorre a formação de pelo menos algumas das ligações citadas anteriormente. A maior parte das etapas mais avançadas na biossíntese das cadeias de GAG, e suas modificações subsequentes, ocorre no **aparelho de Golgi**.

Alongamento da cadeia

Açúcares nucleotídicos apropriados e **glicosiltransferases** altamente específicas, localizadas no aparelho de Golgi, são utilizados para a síntese das cadeias oligossacarídicas dos GAG. Nesse caso, parece haver uma relação de "**uma enzima, uma ligação**", conforme observado no caso de certos tipos de ligações encontradas nas glicoproteínas. Os sistemas enzimáticos envolvidos no alongamento das cadeias são capazes de reproduzir com alta finalidade os GAG complexos.

Terminação da cadeia

Esse processo parece resultar da (1) **sulfatação**, particularmente em determinadas posições dos açúcares, e (2) **progressão** da cadeia de GAG em crescimento para fora do local onde ocorre a catálise na membrana.

Modificações adicionais

Após a formação da cadeia de GAG, ocorrem **numerosas modificações químicas**, como a introdução de grupos sulfato na GalNAc e outras frações, bem como a epimerização de GlcUA para resíduos de IdUA. As enzimas que catalisam a sulfatação são designadas como **sulfotransferases** e utilizam o **3′-fosfoadenosina-5′-fosfossulfato** [PAPS; sulfato ativo] (ver Figura 32-11) como doador de sulfato. Essas enzimas localizadas no aparelho de Golgi são altamente específicas, e enzimas distintas catalisam a sulfatação em posições diferentes (p. ex., carbonos 2, 3, 4 e 6) nos açúcares aceptores. Uma **epimerase** catalisa as conversões dos resíduos glicuronil em iduronil.

Vários glicosaminoglicanos apresentam diferenças na sua estrutura e distribuições características

Os sete GAG citados anteriormente **diferem** entre si quanto a várias das seguintes propriedades: composição de aminoaçúcares, composição de ácido urônico, ligações entre esses componentes, comprimento das cadeias dos dissacarídeos, presença ou ausência de grupos sulfato e suas posições de fixação aos açúcares constituintes, natureza das proteínas centrais às quais estão fixados, natureza da ligação às proteínas centrais, distribuição tecidual e subcelular e funções biológicas.

A seguir, as estruturas (**Figura 48-8**) e as distribuições de cada um dos GAG serão discutidos de modo sucinto. A **Tabela 48-6** fornece um resumo das principais características dos sete GAG.

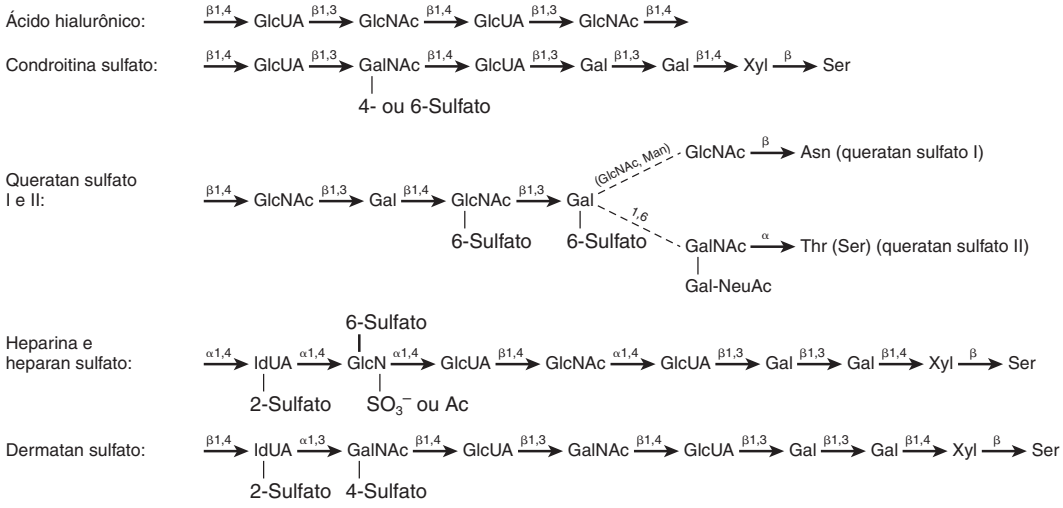


FIGURA 48-8 Resumo das estruturas dos glicosaminoglicanos e suas ligações às proteínas centrais. (Ac, acetil; Asn, L-asparagina; Gal, D-galactose; GalN, D-galactosamina; GlcN, D-glicosamina; GlcUA, ácido D-glicurônico; IdUA, ácido L-idurônico; Man, D-manose; NeuAc, ácido *N*--acetilneuramínico; Ser, L-serina; Thr, L-treonina; Xyl, D-xilose.) As estruturas resumidas são apenas representações qualitativas e não refletem, por exemplo, a composição de ácido urônico dos glicosaminoglicanos híbridos, como a heparina e o dermatan sulfato, que contêm os ácidos L-idurônico e D-glicurônico. Tampouco se deve supor que os substituintes indicados estejam sempre presentes; por exemplo, embora a maioria dos resíduos de ácido idurônico da heparina tenha um grupo 2′-sulfato, uma proporção muito menor desses resíduos é sulfatada no dermatan sulfato. A presença de trissacarídeos de ligação (Gal-GalXyl) na condroitina sulfato, na heparina e heparan sulfato e no dermatan sulfato está assinalada. (Ligeiramente modificada e reproduzida, com autorização, de Lennarz WJ: *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans.* Plenum Press, 1980. Reproduzida com autorização de Springer Science and Business Media.)

TABELA 48-6 Principais propriedades dos glicosaminoglicanos

GAG	Açúcares	Sulfato[1]	Ligação à proteína	Localização
HA	GlcNAc, GlcUA	Nenhum	Nenhuma evidência conclusiva	Líquido sinovial, humor vítreo, tecido conectivo frouxo
CS	GlcNAc, GlcUA	GlcNAc	Xyl-Ser; associado ao HA por proteínas de ligação	Cartilagem, osso, córnea
KS I	GlcNAc, Gal	GlcNAc	GlcNAc-Asn	Córnea
KS II	GlcNAc, Gal	Igual ao KS I	GlcNAc-Thr	Tecido conectivo frouxo
Heparina	GlcN, IdUA	GlcN GlcN IdUA	Ser	Mastócitos
Heparan sulfato	GlcN, GlcUA	GlcN	Xyl-Ser	Fibroblastos da pele, parede da aorta
Dermatan sulfato	GlcNAc, IdUA, (GlcUA)	GalNAc IdUa	Xyl-Ser	Ampla distribuição

[1]O sulfato está ligado a várias posições dos açúcares indicados (ver Figura 48-8).
Observe que todos os GAG (exceto os queratan sulfatos) contêm um ácido urônico (ácido glicurônico ou idurônico).

Ácido hialurônico

O **ácido hialurônico** consiste em uma cadeia não ramificada de unidades dissacarídicas repetidas que contêm GlcUA e GlcNAc. O ácido hialurônico está presente nas bactérias e exibe uma ampla distribuição em vários animais e tecidos, incluindo o líquido sinovial, o corpo vítreo do olho, a cartilagem e os tecidos conjuntivos frouxos.

Condroitina sulfato (condroitina-4-sulfato e condroitina-6-sulfato)

Os proteoglicanos ligados à **condroitina sulfato** pela ligação Xyl-Ser O-glicosídica são componentes importantes da **cartilagem** (ver adiante). O dissacarídeo repetido assemelha-se àquele encontrado no ácido hialurônico e contém GlcUA, porém com substituição da GlcNAc por **GalNAc**. A GalNAc é substituída por **sulfato** em sua posição 4′ ou 6′, com presença de aproximadamente um sulfato para cada unidade dissacarídica.

Queratan sulfato I e II

Conforme ilustrado na Figura 48-8, os queratan sulfatos consistem em unidades dissacarídicas **Gal-GlcNAc** repetidas, que contêm **sulfato** ligado à posição 6′ da GlcNAc ou, em certas ocasiões, da Gal. O tipo I é abundante na **córnea**, enquanto o tipo II é encontrado juntamente com condroitina sulfato ligado ao ácido hialurônico no **tecido conectivo frouxo**. Os tipos I e II apresentam diferentes locais de fixação à proteína (Figura 48-8).

Heparina

O dissacarídeo repetido contém **glicosamina** (GlcN) e um dos dois ácidos urônicos (**Figura 48-9**). Os grupos amino dos resíduos de GlcN são, em sua maioria, ***N*-sulfatados**, porém alguns são acetilados. A GlcN também apresenta um sulfato ligado ao carbono 6.

Cerca de 90% dos resíduos de ácido urônico consistem em **IdUA.** Inicialmente, todos os ácidos urônicos são GlcUA; entretanto, uma 5′-epimerase converte aproximadamente 90% dos resíduos de GlcUA em IdUA após a formação da cadeia polissacarídica. A molécula proteica do proteoglicano heparina é singular, visto que consiste exclusivamente em resíduos de serina e glicina. Cerca de dois terços dos resíduos de serina contêm cadeias de GAG, geralmente de 5 a 15 kDa, porém ocasionalmente muito maiores. A heparina é encontrada nos grânulos dos **mastócitos**, mas também no fígado, nos pulmões e na pele.

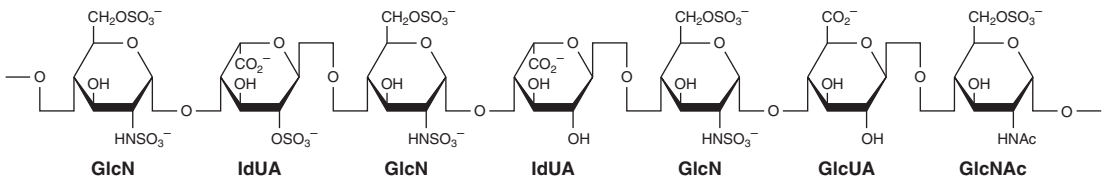


FIGURA 48-9 Estrutura da heparina. A seção do polímero ilustra as características estruturais típicas da heparina; todavia, a sequência das unidades dissacarídicas repetidas e variadamente substituídas foram selecionadas de modo arbitrário. Além disso, podem ocorrer também resíduos de glicosamina não *O*-sulfatada ou 3-*O*-sulfatada. (Modificada, redesenhada e reproduzida, com autorização, de Lindahl U et al.: Structure and biosynthesis of heparin-like polysaccharides. Fed Proc 1977;36:19.)

Heparan sulfato

Essa molécula está presente em muitas **superfícies celulares** na forma de proteoglicano e é extracelular. O heparan sulfato contém **GlcN**, com menos *N*-sulfatos do que a heparina e, diferentemente desta última, o seu ácido urônico predominante é o **GlcUA**.

Dermatan sulfato

Essa substância está amplamente distribuída nos tecidos animais. Sua estrutura assemelha-se àquela da condroitina sulfato, exceto que, no lugar de um GlcUA em ligação β-1,3 à GalNAc, ele contém um **IdUA** em ligação α-1,3 à **GalNAc**. Ocorre formação do IdUA, como na heparina e no heparan sulfato, por 5′-epimerização do GlcUA. Como essa reação é regulada pelo grau de sulfatação, e tendo em vista que a sulfatação é incompleta, o dermatan sulfato contém **ambos** os dissacarídeos IdUA--GalNAc e GlcUA-GalNAc.

As deficiências das enzimas que degradam os glicosaminoglicanos levam ao desenvolvimento das mucopolissacaridoses

Os GAG são degradados por **exoglicosidases** e **endoglicosidases**. À semelhança da maioria das outras biomoléculas, os GAG estão sujeitos à **renovação** e são sintetizados e degradados. Nos tecidos dos adultos, os GAG geralmente exibem uma renovação relativamente **lenta**, com meias-vidas de vários dias a semanas.

A compreensão das vias de degradação dos GAG, como no caso das glicoproteínas (Capítulo 47) e dos glicoesfingolipídeos (Capítulo 24), foi amplamente facilitada pela elucidação das deficiências enzimáticas específicas que ocorrem em determinados **erros inatos do metabolismo**. Quando os GAG estão envolvidos, esses erros inatos são denominados **mucopolissacaridoses** (**Tabela 48-7**).

A **degradação** dos GAG é realizada por uma série de **hidrolases lisossomais**. Essas enzimas incluem determinadas **endogli-**

TABELA 48-7 Defeitos bioquímicos e exames complementares nas mucopolissacaridoses (MPS) e mucolipidoses (ML)

Nome	Designação alternativa[1,2]	Defeito enzimático	Metabólitos urinários
Mucopolissacaridoses			
Hurler (OMIM 607014), Scheie (OMIM 607016), Hurler-Scheie (OMIM 607015)	MPS I	α-L-Iduronidase	Dermatan sulfato, heparan sulfato
Hunter (OMIM 309900)	MPS II	Iduronato-sulfatase	Dermatan sulfato, heparan sulfato
Sanfilippo A (OMIM 252900)	MPS IIIA	Heparan sulfato *N*-sulfatase (sulfamidase)	Heparan sulfato
Sanfilippo B (OMIM 252920)	MPS IIIB	α-*N*-acetilglicosaminidase	Heparan sulfato
Sanfilippo C (OMIM 252930)	MPS IIIC	α-glicosaminida N-acetiltransferase	Heparan sulfato
Sanfilippo D (OMIM 252940)	MPS IIID	*N*-acetilglicosamina-6-sulfatase	Heparan sulfato
Morquio A (OMIM 253000)	MPS IVA	Galactosamina-6-sulfatase	Queratan sulfato, condroitina-6-sulfato
Morquio B (OMIM 253010)	MPS IVB	β-galactosidase	Queratan sulfato
Maroteaux-Lamy (OMIM 253200)	MPS VI	*N*-acetilgalactosamina-4-sulfatase (arilsulfatase B)	Dermatan sulfato
Sly (OMIM 253220)	MPS VII	β-glicuronidase	Dermatan sulfato, heparan sulfato, condroitina-4-sulfato, condroitina-6-sulfato
Mucolipidoses			
Sialidose (OMIM 256550)	ML I	Sialidase (neuraminidase)	Fragmentos de glicoproteínas
Doença da célula I (OMIM 252500)	ML II	N-acetilglicosamina-1-fosfotransferase (por conseguinte, as hidrolases ácidas carecem de resíduos de fosfomanosil)	Fragmentos de glicoproteínas
Pseudopolidistrofia de Hurler (OMIM 252600)	ML III	Igual à ML II, porém a deficiência é incompleta	Fragmentos de glicoproteínas

Fonte: Modificada e reproduzida, com autorização, de DiNatale P, Neufeld EF: The biochemical diagnosis of mucopolysaccharidoses, mucolipidoses and related disorders. In: *Perspectives in Inherited Metabolic Diseases,* vol 2. Barr B et al. (editors). Editiones Ermes (Milan), 1979.

[1]Os fibroblastos, os leucócitos, os tecidos, as células do líquido amniótico ou o soro podem ser utilizados para o ensaio de muitas das enzimas citadas. Os pacientes com esses distúrbios apresentam uma variedade de achados clínicos, que podem incluir opacificação da córnea, retardo mental, rigidez articular, anormalidades cardíacas, hepatoesplenomegalia e baixa estatura, dependendo da doença específica e de sua gravidade.

[2]O termo MPS V não é mais empregado. A existência da MPS VIII (deficiência suspeita de glicosamina-6-sulfatase: OMIM 253230) não foi confirmada. Foi relatado pelo menos um caso de deficiência de hialuronidase (MPS IX; OMIM 601492).

cosidases, várias **exoglicosidases** e **sulfatases**, que atuam geralmente em sequência para degradar os diversos GAG. A Tabela 48-7 fornece uma lista de algumas delas.

As **mucopolissacaridoses** compartilham um mecanismo etiológico comum, conforme ilustrado na **Figura 48-10.** Em geral, essas doenças são transmitidas como **traço autossômico recessivo**, e as mais amplamente estudadas são, talvez, as **síndromes de Hurler** e de **Hunter.** Nenhuma delas é comum. As **características gerais** dessas doenças estão resumidas na **Tabela 48-8** enquanto os **exames laboratoriais** realizados para o seu diagnóstico estão resumidos na **Tabela 48-9**. Em alguns casos, obtém-se uma **história familiar** de mucopolissacaridose.

O termo "**mucolipidose**" foi introduzido para descrever doenças que combinavam características comuns das mucopolissacaridoses e das esfingolipidoses (Capítulo 24). A Tabela 48-7 apresenta três mucolipidoses. Na **sialidose** (mucolipidose I, ML-I), vários oligossacarídeos derivados de glicoproteínas e de alguns gangliosídeos podem acumular-se nos tecidos. A **doença da célula I** (ML-II) e a **pseudopolidistrofia de Hurler** (ML-III) são descritas no Capítulo 47. O termo "mucolipidose" foi mantido, visto que ainda tem uso clínico relativamente amplo, embora não seja apropriado para descrever essas últimas duas doenças, uma vez que o seu mecanismo etiológico envolve uma **localização** incorreta de determinadas enzimas lisossomais. Os defeitos genéticos do catabolismo das cadeias oligossacarídicas das glicoproteínas (p. ex., manosidose, fucosidose) também são descritas no Capítulo 47. Esses defeitos são caracterizados, em sua maioria, pela excreção aumentada de vários fragmentos das glicoproteínas na urina, que se acumulam em virtude do bloqueio metabólico, como no caso das mucolipidoses.

A **hialuronidase** é uma enzima importante envolvida no catabolismo do ácido hialurônico e da condroitina sulfato. Trata-se de uma endoglicosidase amplamente distribuída, que cliva as ligações hexosaminídicas. A partir do ácido hialurônico, a enzima gera um tetrassacarídeo com a estrutura (GlcUAβ-1,3-GlcNAc-β-1,4)$_2$, que pode ser ainda degradado por uma β-glicuronidase e β-*N*-acetil-hexosaminidase. Surpreendentemente, foi relatado apenas um caso de deficiência genética aparente dessa enzima (OMIM 601492).

Os proteoglicanos desempenham numerosas funções

Conforme assinalado anteriormente, os **proteoglicanos** são moléculas acentuadamente complexas, encontradas em **todos os tecidos** do corpo, principalmente na MEC ou "substância fundamental". Os proteoglicanos estão associados entre si e também com os outros componentes estruturais principais da matriz, o colágeno e a elastina, em configurações muito específicas. Alguns proteoglicanos ligam-se ao colágeno, e outros, à elastina. Essas interações são importantes para determinar a organização estrutural da matriz. Alguns proteoglicanos (p. ex., decorina) também podem **ligar-se a fatores de crescimento**, como o TGF-β, modulando seus efeitos nas células. Além disso, alguns deles interagem com determinadas **proteínas adesivas**, como a fibronectina e a laminina (ver parágrafos anteriores), que também estão localizadas na matriz. Os GAG presentes nos proteoglicanos são **poliânions** e, portanto, ligam-se aos policátions e cátions, como o Na^+ e o K^+. Esta última propriedade atrai a água por pressão osmótica para

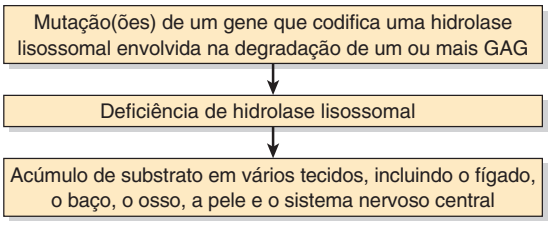


FIGURA 48-10 Esquema simplificado da etiologia de uma mucopolissacaridose, como a síndrome de Hurler (OMIM 607014) na qual a enzima afetada é a α-L-iduronidase. O acúmulo acentuado dos GAG nos tecidos mencionados na figura pode provocar hepatomegalia, esplenomegalia, distúrbios do crescimento, traços faciais grosseiros e retardo mental, respectivamente.

dentro da matriz extracelular, contribuindo para o seu turgor. Os GAG também formam um **gel** em concentrações relativamente baixas. Tendo em vista a natureza extensa e longa das cadeias polissacarídicas dos GAG e a sua capacidade de formar gel, os proteoglicanos podem atuar como **peneiras**, restringindo a passagem de macromoléculas grandes para a MEC, porém permitindo a difusão relativamente livre de pequenas moléculas. Nesse caso também, em virtude de suas estruturas extensas e dos enormes agregados macromoleculares que muitas vezes formam, os GAG ocupam um **grande volume** da matriz em relação às proteínas.

Algumas funções de GAG e proteoglicanos específicos

O **ácido hialurônico** está presente em concentrações particularmente altas nos tecidos embrionários, e acredita-se que ele desempenha um importante papel, possibilitando a **migração celular** durante a morfogênese e a cicatrização das feridas. Nesse aspecto, a sua capacidade de atrair a água para dentro da matriz extracelular e, assim, "afrouxá-la" pode ser importante. As altas concentrações de ácido hialurônico e das condroitina sulfatos presentes na **cartilagem** contribuem para a sua compressibilidade (ver adiante).

As **condroitina sulfatos** estão localizadas nas regiões de calcificação no **osso** endocondral, bem como na **cartilagem.** Estão também presentes dentro de determinados **neurônios** e podem

TABELA 48-8 Resumo das principais características das mucopolissacaridoses

Exibem uma evolução progressiva crônica.
Acometem diversos sistemas orgânicos (i.e., trata-se de distúrbios multissistêmicos).
Muitos pacientes apresentam organomegalia (p. ex., podem ocorrer hepato e esplenomegalia).
Frequentemente, os pacientes apresentam disostose múltipla (caracterizada por anormalidades graves no desenvolvimento da cartilagem e do osso, bem como retardo mental).
Com frequência, os pacientes apresentam traços faciais anormais (aspecto facial).
Outros sinais algumas vezes observados consistem em anormalidades da audição, da visão, do sistema cardiovascular e do desenvolvimento mental.

TABELA 48-9 Alguns exames laboratoriais usados no diagnóstico de mucopolissacaridose

Exame de urina para a presença de quantidades aumentadas de GAG.
Ensaios das enzimas suspeitas em leucócitos, fibroblastos ou, possivelmente, soro.
Biópsia tecidual com análise subsequente dos GAG por eletroforese.
Uso de testes genéticos específicos.
Atualmente, pode-se estabelecer um diagnóstico pré-natal pelo menos em alguns casos, utilizando células do líquido amniótico ou biópsia das vilosidades coriônicas.

TABELA 48-10 Algumas funções dos glicosaminoglicanos e proteoglicanos

• Atuam como componentes estruturais da MEC
• Apresentam interações específicas com o colágeno, a elastina, a fibronectina, a laminina e a outras proteínas, como os fatores de crescimento
• Como poliânions, ligam-se a policátions e cátions
• Contribuem para o turgor característico de vários tecidos
• Funcionam como peneiras na MEC
• Facilitam a migração celular (HA)
• Exercem um papel na compressibilidade da cartilagem na sustentação do peso (HA, CS)
• Desempenham um papel na transparência da córnea (KS I e DS)
• Têm uma função estrutural na esclera (DS)
• Atuam como anticoagulantes (heparina)
• São componentes das membranas plasmáticas, onde podem atuar como receptores e participar na adesão celular e nas interações intercelulares (p. ex., HS)
• Determinam a seletividade de carga do glomérulo renal (HS)
• Constituem as vesículas sinápticas e outras vesículas (p. ex., HS)

Abreviaturas: CS, condroitina sulfato; DS, dermatan sulfato; MEC, matriz extracelular; HA, ácido hialurônico; HS, heparan sulfato; KS I, queratan sulfato I.

proporcionar uma estrutura endoesquelética, ajudando a manter a sua forma.

Tanto o **queratan sulfato I** quanto o **dermatan sulfato** estão presentes na **córnea.** Localizam-se entre as fibrilas de colágeno e desempenham um papel crucial na transparência da córnea. As alterações na composição dos proteoglicanos observadas nas cicatrizes de córnea desaparecem quando a córnea cicatriza. A presença de dermatan sulfato na **esclera** também pode desempenhar um papel na manutenção do formato global do olho. O queratan sulfato I também está presente na **cartilagem**.

A **heparina** é um **anticoagulante** importante, ela liga-se aos fatores IX e XI, porém a sua interação mais importante envolve a **antitrombina plasmática** (discutida no Capítulo 51). A heparina também pode ligar-se especificamente à **lipase lipoproteica** presente nas paredes capilares, causando a liberação dessa enzima na circulação.

Alguns proteoglicanos (p. ex., **heparan sulfato**) estão associados à membrana plasmática das células, e suas proteínas centrais atravessam a membrana de um lado ao outro. Nessa estrutura, podem atuar como **receptores** e também podem participar como mediadores do **crescimento celular** e da **comunicação intercelular**. A fixação das células a seu substrato em cultura é mediada, pelo menos em parte, pelo heparan sulfato. Esse proteoglicano também é encontrado na **membrana basal dos rins**, juntamente com o colágeno tipo IV e a laminina (ver anteriormente), onde desempenham um importante papel na determinação da seletividade de cargas da filtração glomerular.

Os proteoglicanos também são encontrados em **localizações intracelulares**, como o núcleo; nessa organela, a sua função ainda não foi elucidada. Estão presentes em alguns grânulos de armazenamento ou de secreção, como os grânulos cromafins da medula suprarrenal. Foi postulado que os proteoglicanos desempenham um papel na liberação do conteúdo desses grânulos. A **Tabela 48-10** fornece um resumo das várias funções dos GAG.

Associações com doenças importantes e com o envelhecimento

O ácido hialurônico pode ser importante no sentido de permitir a **migração das células tumorais** através da MEC. As células tumorais podem induzir os fibroblastos a sintetizar quantidades acentuadamente aumentadas desse GAG, talvez facilitando, assim, a sua própria disseminação. Algumas células tumorais possuem menos heparan sulfato em suas superfícies, e isso pode desempenhar um papel na **falta de adesividade** apresentada por essas células.

A íntima da **parede arterial** contém proteoglicanos, como ácido hialurônico e condroitina sulfato, dermatan sulfato e heparan sulfato. Entre esses proteoglicanos, o dermatan sulfato liga-se às lipoproteínas de baixa densidade do plasma, e, além disso, também parece constituir o principal GAG sintetizado pelas células musculares lisas das artérias. Como são essas células que proliferam nas **lesões ateroscleróticas** das artérias, o dermatan sulfato pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento da placa aterosclerótica.

Em vários tipos de **artrite**, os proteoglicanos podem atuar como **autoantígenos**, contribuindo, assim, para as manifestações patológicas dessas doenças. A quantidade de condroitina sulfato na cartilagem diminui de acordo com a idade, enquanto as quantidades de queratan sulfato e de ácido hialurônico aumentam. Essas mudanças podem contribuir para o desenvolvimento da **osteoartrite**, assim como a atividade aumentada da enzima agrecanase, que atua na degradação do agrecano. São também observadas alterações nas quantidades de determinados GAG da pele no **envelhecimento**, ajudando a explicar as modificações características observadas nesse órgão com o envelhecimento.

Uma nova e interessante fase na pesquisa dos proteoglicanos começou com os achados de que as mutações que afetam determinados proteoglicanos ou as enzimas necessárias para a sua síntese alteram a regulação de **vias de sinalização específicas** em *Drosophila* e *Caenorhabditis elegans,* afetando, assim, o **desenvolvimento**; já parece provável que existam efeitos semelhantes nos camundongos e nos seres humanos.

O OSSO É UM TECIDO CONECTIVO MINERALIZADO

O osso contém materiais tanto orgânicos quanto inorgânicos. A matéria orgânica consiste principalmente em proteína. A Tabela 48-11 fornece uma lista das principais proteínas do osso; o colágeno tipo I é a principal, representando 90 a 95% do material orgânico. O colágeno tipo V também está presente em quantidades pequenas, assim como várias proteínas não colágeno, algumas das quais são relativamente específicas do osso. O componente inorgânico ou mineral consiste principalmente em hidroxiapatita cristalina – $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ –, juntamente com sódio, magnésio, carbonato e fluoreto; cerca de 99% do cálcio do corpo estão localizados no osso (Capítulo 44). A hidroxiapatita confere ao osso a sua força e resiliência necessárias para suas funções fisiológicas.

O osso é uma **estrutura dinâmica** que sofre ciclos contínuos de remodelagem, os quais consistem em reabsorção seguida de deposição de novo tecido ósseo. Essa remodelagem permite ao osso adaptar-se a sinais tanto físicos (p. ex., aumento na sustentação do peso) quanto hormonais.

Os principais tipos de células envolvidos na reabsorção e deposição ósseas são os **osteoclastos** e os **osteoblastos** (**Figura 48-11**). Os osteoclastos estão associados à reabsorção, enquanto os osteoblastos estão envolvidos na deposição de osso. Os osteócitos originam-se dos osteoblastos; parecem estar também envolvidos na manutenção da matriz óssea, porém não serão discutidos de modo mais detalhado neste capítulo.

Os osteoclastos são células multinucleadas que se originam de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes. Eles possuem um domínio na membrana apical, exibindo uma borda ondulada que desempenha um papel fundamental na reabsorção óssea (**Figura 48-12**). Uma ATPase de translocação de prótons expele os prótons através da borda ondulada para dentro da área de reabsorção, que é o microambiente de pH baixo ilustrado na figura. Isso reduz o pH local para 4,0 ou menos, aumentando, assim, a solubilidade da hidroxiapatita e permitindo a ocorrência da desmineralização. As proteases ácidas lisossomais são liberadas e digerem as proteínas de matriz que agora estão acessíveis. Os **osteoblastos** – as células mononucleares que derivam de precursores mesenquimais pluripotentes – sintetizam a maior parte das proteínas encontradas no osso (Tabela 48-11), bem como vários fatores de crescimento e citocinas. Essas células são responsáveis pela deposição de nova matriz óssea (osteoide) e pela sua mineralização subsequente. Os osteoblastos controlam a mineralização ao regular a passagem dos íons cálcio e fosfato através de suas membranas de superfície. Estas últimas contêm fosfatase alcalina, que é utilizada para gerar íons fosfato a partir de fosfatos orgânicos. Os mecanismos envolvidos na mineralização ainda não estão totalmente elucidados, porém diversos fatores foram implicados. A fosfatase alcalina contribui para a mineralização, no entanto não é suficiente isoladamente. Foram descritas vesículas pequenas (vesículas da matriz) contendo cálcio e fosfato nos locais de mineralização, mas a sua função ainda não foi esclarecida. O colágeno tipo I parece ser necessário, e a mineralização torna-se inicialmente evidente nos espaços entre moléculas sucessivas. Recentemente, houve interesse nas fosfoproteínas ácidas, como a sialoproteína do osso, que atuam em locais de nucleação. Essas proteínas contêm motivos (p. ex., sequências poli-Asp e poli-Glu) que se ligam ao cálcio e que podem fornecer uma estrutura inicial para o processo de mineralização. Algumas macromoléculas, como certos proteoglicanos e glicoproteínas, também podem atuar como inibidores da nucleação.

TABELA 48-11 As principais proteínas encontradas no osso[1]

Proteínas	Comentários
Colágenos	
Colágeno tipo I	Cerca de 90% das proteínas ósseas totais. Formado de duas cadeias α1(I) e uma cadeia α2(II).
Colágeno tipo V	Componente menor.
Proteínas não colágeno	
Proteínas plasmáticas	Mistura de várias proteínas plasmáticas.
Proteoglicanos[2] CS-PG I (biglicano)	Contêm duas cadeias de GAG; encontrados em outros tecidos.
CS-PG II (decorina)	Contém uma cadeia de GAG; encontrado em outros tecidos.
CS-PG III	Específica do osso.
Proteína SPARC óssea[3] (osteonectina)	Não específica do osso.
Osteocalcina (proteína Gla óssea)	Contém resíduos de γ-carboxiglutamato (Gla) que se ligam à hidroxiapatita. Específica do osso.
Osteopontina	Não específica do osso, glicosilada e fosforilada.
Sialoproteína óssea	Específica do osso. Acentuadamente glicosilada e sulfatada na tirosina.
Proteínas morfogenéticas do osso (BMP)	Família de proteínas secretadas (oito ou mais) com uma variedade de ações sobre o osso; muitas induzem o crescimento de osso ectópico.
Osteoprotegerina	Inibe a osteoclastogênese.

[1]Várias funções foram atribuídas às proteínas não colágeno, inclusive na mineralização; todavia, a maioria dessas funções ainda é especulativa. Considera-se improvável que as proteínas não colágeno que não são específicas do osso possam desempenhar um papel essencial na mineralização. Várias outras proteínas também estão presentes no osso, incluindo uma proteína da matriz ácida rica em tirosina (TRAMP), alguns fatores de crescimento (p. ex., TGFβ) e enzimas envolvidas na síntese do colágeno (p. ex., lisil-oxidase).
[2]CS-PG, condroitina sulfato – proteoglicano; esses compostos assemelham-se aos dermatan sulfato-PG (DS-PG) da cartilagem (Tabela 48-13).
[3]SPARC, proteína secretada ácida e rica em cisteína.

Estima-se que cerca de 4% do osso compacto sejam **renovados anualmente** no adulto saudável típico, enquanto ocorre reposição de aproximadamente 20% do osso trabecular.

Muitos fatores estão envolvidos na **regulação do metabolismo ósseo,** desses, apenas alguns serão mencionados aqui (ver Caso nº 15 sobre osteoporose, Capítulo 57). Alguns **estimulam os osteoblastos** (p. ex., paratormônio e 1,25-di-hidroxicolecalciferol), enquanto outros os **inibem** (p. ex., corticosteroides). O paratormônio e o 1,25-di-hidroxicolecalciferol também estimulam os osteoclastos, enquanto a calcitonina e os estrogênios inibem essas células.

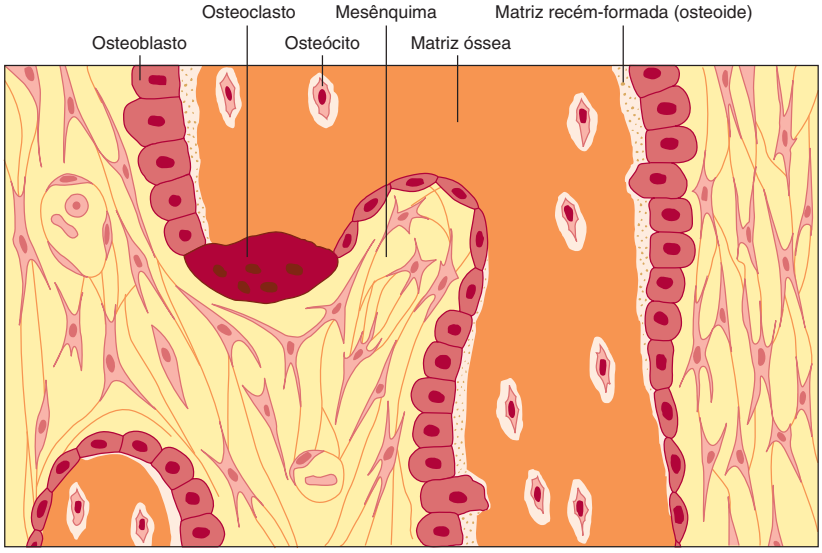


FIGURA 48-11 Ilustração esquemática das células principais presentes no osso membranoso. Os osteoblastos (mais claros) sintetizam colágeno tipo I, que forma uma matriz que retém as células. À medida que isso ocorre, os osteoblastos diferenciam-se gradualmente em osteócitos. (Reproduzida, com autorização, de Junqueira LC, Carneiro J: *Basic Histology: Text & Atlas,* 10th ed. McGraw-Hill, 2003.)

O OSSO É AFETADO POR MUITOS DISTÚRBIOS METABÓLICOS E GENÉTICOS

A **Tabela 48-12** fornece uma lista de vários dos exemplos mais importantes de distúrbios metabólicos e genéticos que acometem o osso.

A **osteogênese imperfeita** (ossos quebradiços) caracteriza-se por uma fragilidade anormal dos ossos. Com frequência, as escleras estão anormalmente finas e translúcidas, podendo parecer azuladas em virtude da deficiência de tecido conectivo. Foram reconhecidos **quatro tipos** dessa doença (leve, extensa, severa e variável), dos quais o tipo extenso, que ocorre no recém-nascido, é o mais grave. Os lactentes acometidos podem nascer com múltiplas fraturas e não sobrevivem. Mais de 90% dos pacientes com osteogênese imperfeita apresentam mutações dos genes *COL1A1* e *COL1A2*, os quais codificam as cadeias proα1(I) e proα2(I), respectivamente. Mais de 100 mutações desses dois genes foram documentadas e incluem deleções parciais dos genes

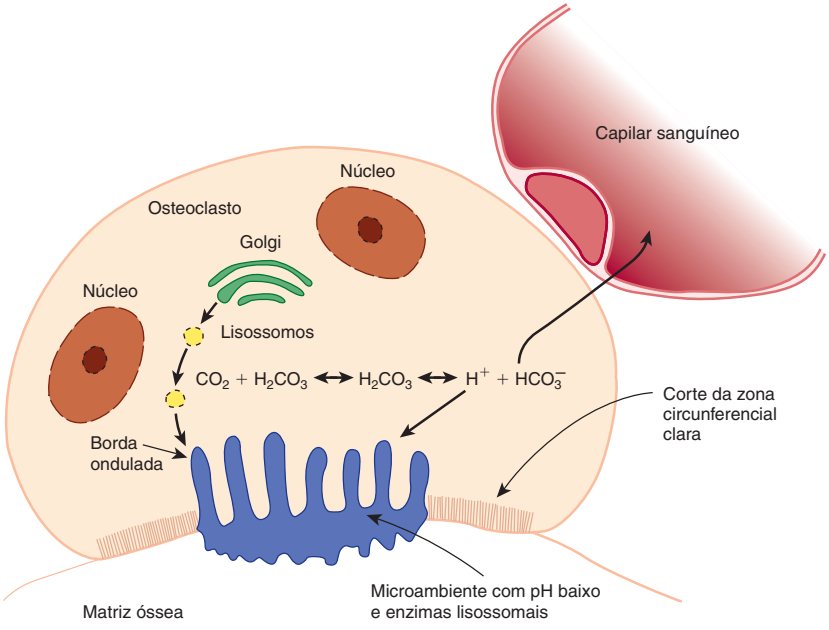


FIGURA 48-12 Ilustração esquemática de alguns aspectos da função do osteoclasto na reabsorção óssea. As enzimas lisossomais e os íons hidrogênio são liberados no microambiente confinado, criado pela fixação entre a matriz óssea e a zona periférica clara do osteoclasto. A acidificação desse espaço confinado facilita a dissolução do fosfato de cálcio do osso e constitui o pH ideal para a atividade das hidrolases lisossomais. Dessa maneira, a matriz óssea é removida, e os produtos da reabsorção óssea são captados no citoplasma do osteoclasto, provavelmente digeridos e transferidos para os capilares. A equação química apresentada na figura refere-se à ação da anidrase carbônica II, descrita no texto. (Reproduzida, com autorização, de Junqueira LC, Carneiro J: *Basic Histology: Text & Atlas,* 10th ed. McGraw-Hill, 2003.)

TABELA 48-12 Algumas doenças metabólicas e genéticas que afetam o osso e a cartilagem

Doença	Comentários
Nanismo	Muitas vezes, ocorre devido a uma deficiência do hormônio do crescimento, porém apresenta muitas outras causas.
Raquitismo	Devido a uma deficiência de vitamina D durante a infância.
Osteomalacia	Devido a uma deficiência de vitamina D durante a vida adulta.
Hiperparatireoidismo	O excesso de paratormônio causa reabsorção óssea.
Osteogênese imperfeita (p. ex., OMIM 166200)	Devido a uma variedade de mutações dos genes *COL1A1* e *COL1A2* que afetam a síntese e a estrutura do colágeno tipo I.
Osteoporose (OMIM 166710)	Geralmente na pós-menopausa ou, em outros casos, é mais gradual e relacionada com a idade; um pequeno número de casos é devido a mutações dos genes *COL1A1* e *COL1A2* e, possivelmente, do gene do receptor da vitamina D.
Osteoartrite	Um pequeno número de casos é devido a mutações do gene *COL1A*.
Várias condrodisplasias	Devido a mutações do gene *COL2A1*.
Síndrome de Pfeiffer[1] (OMIM 101600)	Mutações do gene que codifica o receptor do fator de crescimento dos fibroblastos 1 (FGFR1).
Síndromes de Jackson-Weiss (OMIM 123150) e de Crouzon (OMIM 123500)[1]	Mutações do gene que codifica o FGFR2.
Acondroplasia (OMIM 100800) e displasia tanatofórica (OMIM 187600)[2]	Mutações do gene que codifica o FGFR3.

[1]As síndromes de Pfeiffer, de Jackson-Weiss e de Crouzon consistem em síndromes de craniossinostose; a craniossisnostose é um termo usado para descrever a fusão prematura das suturas cranianas.
[2]A displasia tanatofórica (do grego *thanatos,* "morte" + *phoros* + "portador de") constitui a displasia esquelética neonatal fatal mais comum, exibindo manifestações semelhantes àquelas da acondroplasia homozigota.

e duplicações. Outras mutações afetam o *splicing* do RNA, e o tipo mais frequente resulta na **substituição da glicina** por outro aminoácido mais volumoso, afetando a formação da tripla-hélice. Em geral, essas mutações resultam em expressão diminuída do colágeno ou em cadeias pro estruturalmente anormais, que se reúnem em **fibrilas anormais**, enfraquecendo a estrutura global do osso. Quando uma cadeia anormal está presente, ela pode interagir com duas cadeias normais, porém o dobramento pode ser impedido, resultando em degradação enzimática de todas as cadeias. Esse processo, denominado "**suicídio do pró-colágeno**", fornece um exemplo de uma mutação negativa dominante, um resultado frequentemente observado quando uma proteína consiste em múltiplas subunidades diferentes.

A **osteopetrose** (doença do osso marmóreo), caracterizada por um **aumento da densidade óssea**, é causada pela incapacidade de reabsorção óssea, e uma das formas ocorre com acidose tubular renal e calcificação cerebral. É causada por mutações do gene (localizado no cromossomo 8q22) que codifica a **anidrase carbônica II** (CA II), uma das quatro isoenzimas da anidrase carbônica presente nos tecidos humanos. A reação catalisada pela anidrase carbônica é a seguinte:

$$CO_2 + HO_2 \leftrightarrow HO_2CO_3 \leftrightarrow HO^+ + HCO^-_3$$

Nos osteoclastos envolvidos na reabsorção óssea, a CA II, aparentemente, fornece prótons para neutralizar os íons OH^- que se encontram dentro da célula quando os íons H^+ são bombeados através das bordas onduladas (ver anteriormente). Desta maneira, **se a atividade da CA II estiver deficiente** nos osteoclastos, não irá ocorrer reabsorção óssea normal, com consequente desenvolvimento de osteopetrose. O mecanismo da calcificação cerebral não está bem esclarecido, enquanto a acidose tubular renal reflete a atividade deficiente da CA II nos túbulos renais.

A **osteoporose** (ver História de Caso nº 15, no Capítulo 57) é causada por uma redução progressiva e generalizada da massa de tecido ósseo por unidade de volume, causando enfraquecimento do esqueleto. A razão entre **elementos minerais** e **orgânicos** não é alterada no osso normal remanescente. As fraturas de vários ossos, como a cabeça do fêmur, ocorrem com muita facilidade e representam um enorme ônus tanto para os pacientes acometidos quanto para o orçamento de assistência à saúde da sociedade. Entre outros fatores, os **estrogênios** e as citocinas **interleucinas-1** e **6** parecem estar estreitamente envolvidos na etiologia da osteoporose.

OS PRINCIPAIS COMPONENTES DA CARTILAGEM SÃO O COLÁGENO TIPO II E DETERMINADOS PROTEOGLICANOS

As **principais proteínas** da cartilagem hialina (o principal tipo de cartilagem) são mencionadas na **Tabela 48-13**. O **colágeno tipo II** é a principal proteína (**Figura 48-13**), e vários outros tipos menores de colágeno também estão presentes. Além desses componentes, a cartilagem elástica contém elastina, enquanto a cartilagem fibroelástica contém colágeno tipo I. A cartilagem é constituída por diversos **proteoglicanos**, que desempenham um importante papel na sua compressibilidade. O **agrecano** (com cerca de 2×10^3 kDa) é o proteoglicano principal. Conforme ilustrado na **Figura 48-14**, o agrecano apresenta uma estrutura muito complexa e contém vários GAG (ácido hialurônico, condroitina sulfato e queratan sulfato), bem como proteínas de ligação e proteínas centrais. A proteína central apresenta três domínios: A, B e C. O ácido hialurônico liga-se de modo não covalente ao domínio A da proteína central, bem como à proteína de ligação, que estabiliza as interações entre o hialuronato e a proteína central. As cadeias de queratan sulfato estão localizadas no domínio B, enquanto as cadeias de condroitina sulfato estão situadas no domínio C; ambos os tipos de GAG estão ligados de forma covalente à proteína central. A proteína central também contém cadeias oligossacarídicas *O*- e *N*-ligadas.

TABELA 48-13 As principais proteínas encontradas na cartilagem

Proteínas	Comentários
Proteínas do colágeno	
Colágeno tipo II	De 90 a 98% do colágeno total da cartilagem articular. Composto de três cadeias α 1(II).
Colágenos V, VI, IX, X, XI	Ligações cruzadas entre os colágenos tipos IX e II. O tipo XI pode ajudar a controlar o diâmetro das fibrilas do tipo II.
Proteínas não colagenosas	
Proteoglicanos	O principal proteoglicano da cartilagem.
Agrecano	Encontrado em alguns tipos de cartilagem.
Proteoglicano grande não agregador DS-PG I (biglicano)[1] DS-PG II (decorina)	 Semelhante ao CS-PG I do osso. Semelhante ao CS-PG II do osso.
Condronectina	Pode desempenhar um papel na ligação do colágeno tipo II à superfície da cartilagem.
Ancorina C II	Pode ligar o colágeno tipo II à superfície do condrócito.

[1]As proteínas centrais do DS-PG I e do DS-PG II são homólogas às do CS-PG I e CS-PG II do osso (Tabela 48-11). Uma possível explicação é que os osteoblastos carecem da epimerase necessária para converter o ácido glicurônico em ácido idurônico, este último encontrado no dermatan sulfato.

Os outros proteoglicanos encontrados na cartilagem apresentam estruturas mais simples que a do agrecano.

A **condronectina** está envolvida na fixação do colágeno tipo II aos condrócitos.

A cartilagem é um tecido avascular, que obtém a maior parte de seus nutrientes a partir do líquido sinovial. Apresenta uma **renovação lenta**, porém contínua. Várias **proteases** (p. ex., colagenases e estromalisina), sintetizadas pelos condrócitos, podem **degradar o colágeno** e as outras proteínas encontradas na cartilagem. A interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral α (TNFα) parecem estimular a produção dessas proteases, enquanto o fator de transformação do crescimento β (TGFβ) e o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-I) geralmente exercem uma influência anabólica sobre a cartilagem.

AS BASES MOLECULARES DAS CONDRODISPLASIAS INCLUEM MUTAÇÕES DOS GENES QUE CODIFICAM O COLÁGENO TIPO II E OS RECEPTORES DOS FATORES DE CRESCIMENTO DOS FIBROBLASTOS

As condrodisplasias constituem um grupo de distúrbios hereditários mistos que acometem a cartilagem. Manifestam-se por nanismo com membros curtos e numerosas deformidades esqueléticas. Algumas das condrodisplasias são causadas por uma variedade de mutações do gene *COL2A1*, levando à produção de formas anormais de colágeno tipo II. Um exemplo é a **síndrome de Stickler**, manifestada pela degeneração da cartilagem articular e do corpo vítreo do olho.

Entre as condrodisplasias, a mais bem conhecida é a **acondrodisplasia**, a causa mais comum de **nanismo com membros curtos**. Os indivíduos acometidos possuem membros curtos, tronco de dimensões normais, macrocefalia e várias outras anormalidades esqueléticas. Com frequência, o distúrbio é herdado com caráter autossômico dominante, porém muitos casos são devidos a novas mutações. A base molecular da acondroplasia está esquematizada na **Figura 48-15**. A acondroplasia não é um distúrbio do colágeno, porém é causada por mutações do gene que codifica o **receptor do fator de crescimento dos fibroblastos 3 (FGFR3)**. **Os fatores de crescimento dos fibroblastos** compreendem uma família de pelo menos nove proteínas que afetam o crescimento e a diferenciação das células de origem mesenquimal e neuroectodérmica. Seus **receptores** são proteínas transmembrana e constituem um subgrupo da família

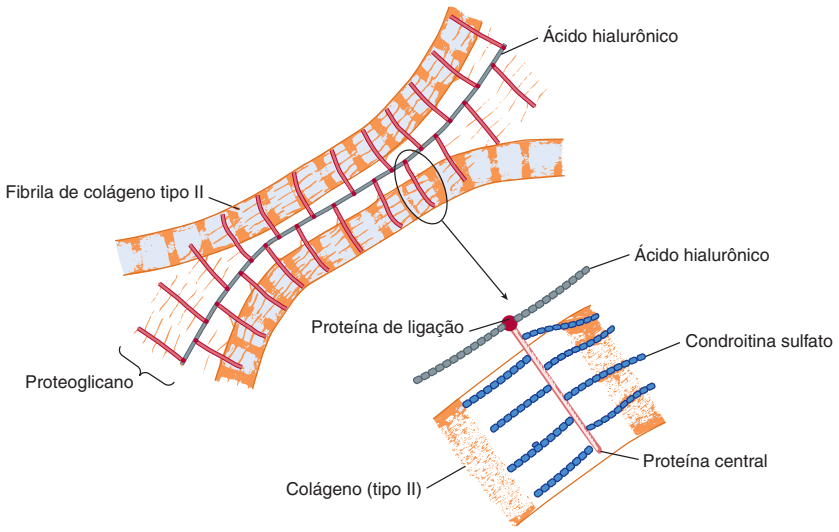


FIGURA 48-13 Representação esquemática da organização molecular da matriz cartilaginosa. As proteínas de ligação ligam de modo não covalente a proteína central (cor mais clara) dos proteoglicanos às moléculas lineares de ácido hialurônico (cor mais escura). As cadeias laterais de condroitina sulfato do proteoglicano ligam-se eletrostaticamente às fibrilas de colágeno, formando uma matriz de ligação cruzada. A marcação oval circunda a área ampliada na parte inferior da figura. (Reproduzida, com autorização, de Junqueira LC, Carneiro J: *Basic Histology: Text & Atlas,* 10th ed. McGraw-Hill, 2003.)

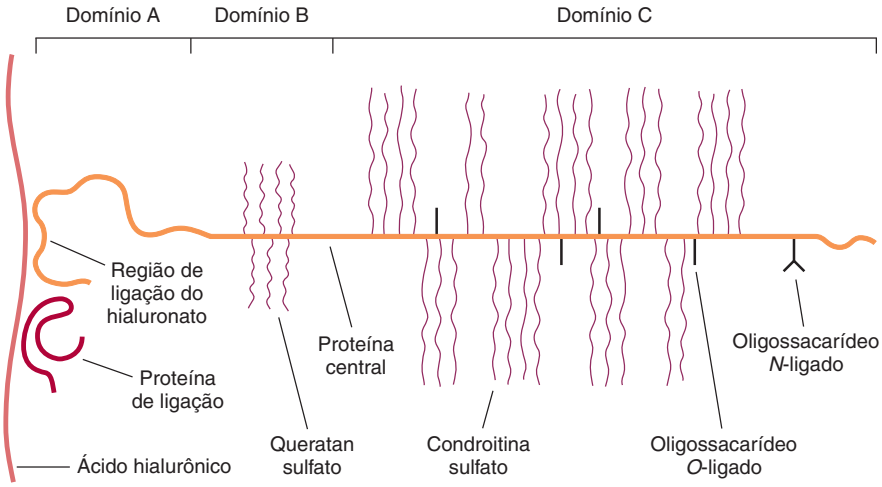


FIGURA 48-14 Ilustração esquemática do agrecano da cartilagem nasal bovina. Uma fita de ácido hialurônico está representada à esquerda. A proteína central (cerca de 210 kDa) apresenta três domínios principais. O domínio A, localizado em sua extremidade aminoterminal, interage com aproximadamente cinco dissacarídeos repetidos no hialuronato. A proteína de ligação interage com o hialuronato e com o domínio A, estabilizando suas interações. Aproximadamente 30 cadeias de queratan sulfato estão fixadas por meio de ligações GalNAc-Ser ao domínio B. O domínio C contém cerca de 100 cadeias de condroitina sulfato unidas por ligações Gal-Gal-Xyl-Ser, e cerca de 40 cadeias oligossacarídicas *O*-ligadas. Uma ou mais cadeias de glicanos *N*-ligados também são encontradas próximo à extremidade carboxiterminal da proteína central. (Moran LA, et al., *Biochemistry,* 2nd edition, © 1994, p. 9 a 43. Adaptada, com autorização, de Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, NJ.)

dos receptores tirosina-quinase. O FGFR3 é um membro desse subgrupo de quatro e medeia as ações do FGF3 na cartilagem. Em quase todos os casos de acondroplasia que foram investigados, foram identificadas mutações envolvendo o nucleotídeo 1138, resultando na substituição da glicina pela arginina (resíduo número 380) no domínio transmembrana da proteína, tornando-a inativa. Esse tipo de mutação não foi encontrado em indivíduos normais.

Curiosamente, outras mutações do mesmo gene podem resultar em **hipocondroplasia, displasia tanatofórica** (tipos I e II) e **fenótipo SADDAN** (acondroplasia severa com retardo do desenvolvimento e acantose *nigricans* [esta última consiste em hiperpigmentação castanha a preta da pele]).

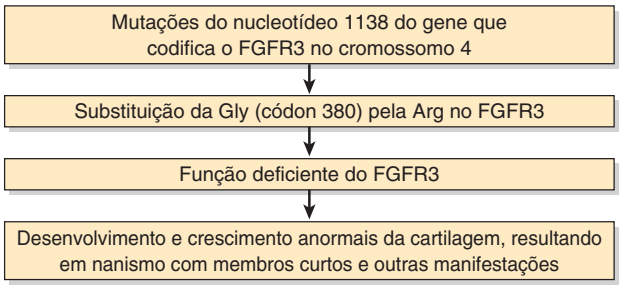


FIGURA 48-15 Esquema simplificado da etiologia da acondroplasia (OMIM 100800). Na maioria dos casos estudados até o momento, a mutação tem consistido em uma transição de G para A no nucleotídeo 1138. Em alguns casos, a mutação envolveu uma transversão de G para C no mesmo nucleotídeo. Esse nucleotídeo particular constitui um verdadeiro "ponto crítico" para a mutação. Ambas as mutações resultam na substituição do resíduo de Gly por um resíduo de Arg no segmento transmembrana do receptor. Foram também relatados alguns casos envolvendo a substituição de Gly por Cys no códon 375.

Conforme indicado na Tabela 48-12, **outras displasias esqueléticas** (incluindo algumas síndromes de craniossinostose) também são causadas por mutações dos genes que codificam receptores dos FGF. Foi constatado que outro tipo de displasia esquelética (displasia diastrófica) é devido à mutação de um transportador de sulfato. Portanto, graças à tecnologia do DNA recombinante, iniciou-se uma nova era na elucidação das displasias esqueléticas.

RESUMO

- Os principais componentes da MEC consistem em proteínas estruturais – o colágeno, a elastina e a fibrilina-1 –, diversas proteínas especializadas (p. ex., fibronectina e laminina) e vários proteoglicanos.
- O colágeno constitui a proteína mais abundante no reino animal; foram isolados aproximadamente 28 tipos. Todos os colágenos contêm extensões maiores ou menores de hélice tripla e uma estrutura repetitiva $(Gly\text{-}X\text{-}Y)_n$.
- A biossíntese do colágeno é complexa e caracteriza-se por muitos eventos pós-tradução, incluindo hidroxilação da prolina e da lisina.
- As doenças associadas a uma síntese comprometida do colágeno incluem o escorbuto, a osteogênese imperfeita, a síndrome de Ehlers-Danlos (muitos tipos) e a doença de Menkes.
- A elastina confere extensibilidade e retração elástica aos tecidos. Ela carece de hidroxilisina, sequências Gly-X-Y, estrutura helicoidal tripla e açúcares, porém contém ligações cruzadas de desmosina e isodesmosina não encontradas no colágeno.
- A fibrilina-1 localiza-se nas microfibrilas. As mutações do gene que codifica a fibrilina-1 causam a síndrome de Marfan. A citocina TGF-β parece contribuir para a patologia cardiovascular.

- Os glicosaminoglicanos (GAG) são constituídos por dissacarídeos repetidos contendo um ácido urônico (ácido glicurônico ou idurônico) ou uma hexose (galactose) e uma hexosamina (galactosamina ou glicosamina). Com frequência, existe também um sulfato.
- Os principais GAG são o ácido hialurônico, a condroitina-4 sulfato e 6-sulfato, o queratan sulfato I e II, a heparina, o heparan sulfato e o dermatan sulfato.
- Os GAG são sintetizados pelas ações sequenciais de um conjunto de enzimas específicas (glicosiltransferases, epimerases, sulfotransferases, etc) e são degradados pela ação sequencial de hidrolases lisossomais. As deficiências genéticas destas últimas enzimas resultam nas mucopolissacaridoses (p. ex., síndrome de Hurler).
- Os GAG ocorrem nos tecidos ligados a várias proteínas (proteínas de ligação e proteínas centrais), constituindo os proteoglicanos. Com frequência, essas estruturas apresentam um peso molecular muito alto e desempenham muitas funções nos tecidos.
- Muitos componentes da MEC ligam-se às proteínas da superfície celular, conhecidas como integrinas; isso constitui uma via pela qual o meio externo da célula pode comunicar-se com o meio interior.
- O osso e a cartilagem são formas especializadas de MEC. O colágeno tipo I e a hidroxiapatita constituem os principais componentes do osso. O colágeno tipo II e alguns proteglicanos são os principais constituintes da cartilagem.
- As causas moleculares de várias doenças hereditárias do osso (p. ex., osteogênese imperfeita) e da cartilagem (p. ex., condrodistrofias) estão sendo reveladas pela aplicação da tecnologia do DNA recombinante.

REFERÊNCIAS

Baldridge D, Shchelochkov O, Kelley B, Lee B: Signaling pathways in human skeletal dysplasias. Annu Rev Genomics Human Genet 2010;11:189.

Couchman JR: Transmembrane signaling proteoglycans. Annu Rev Cell Develop Biol 2010;26:89.

Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, et al: *Harrison's Principles of Internal Medicine,* 17th ed. McGrawHill, 2008. (Chapter 357, *Heritable Disorders of Connective Tissue;* Chapter 355, *Lysosomal Storage Diseases;* Chapter 326, *Osteoarthritis;* Chapter 346, *Bone and Mineral Metabolism in Health and Disease;* Chapter 349, *Paget Disease and Other Dysplasias of Bone*).

Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C: Genetic control of bone formation. Ann Rev Cell Develop Biol 2009;25:629.

Khosla S, Westendorf JJ, Oursler MJ: Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. J Clin Invest 2008; 118:421.

Neufeld EF: From serendipity to therapy. Annu Rev Biochem 2011;80. (Describes pioneering work on the causes and treatment of mucopolysaccharidoses).

Rowe RG, Weiss SJ: Navigating ECM barriers at the invasive front: the cancer cell–stroma interface. Annu Rev Cell Develop Biol 2009;25:567.

Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 8th ed. McGraw-Hill, 2001. (This comprehensive four-volume text and the updated online version [see Chapter 1] contain chapters on disorders of collagen biosynthesis and structure, Marfan syndrome, the mucopolysaccharidoses, achondroplasia, Alport syndrome, and craniosynostosis syndromes.)

Seeman E, Delams PD: Bone quality—the material and structural basis of bone strength and fragility. N Engl J Med 2006;354:2250.

Shoulders MD, Raines RT: Collagen structure and stability. Ann Rev Biochem 2009;78:929.

CAPÍTULO

49

O Músculo e o Citoesqueleto

Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Entender as características bioquímicas gerais da contração dos músculos esquelético, cardíaco e liso.
- Conhecer os efeitos biológicos do óxido nítrico (NO).
- Indicar os diferentes combustíveis metabólicos necessários para uma corrida de velocidade e para uma maratona.
- Identificar as estruturas gerais e as funções dos principais componentes do citoesqueleto: microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermediários.
- Compreender as bases da hipertermia maligna, distrofia muscular de Duchenne e de Becker, miocardiopatias hereditárias, síndrome de Hutchinson-Gilford (progéria) e várias doenças cutâneas devido à presença de queratinas anormais.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

As proteínas desempenham um importante papel no **movimento** tanto em nível orgânico (p. ex., músculo esquelético, coração e intestino) quanto em nível celular. Neste capítulo, são descritas as funções de proteínas específicas e de algumas outras moléculas essenciais (p. ex., Ca^{2+}) na **contração muscular**. O capítulo também apresenta uma descrição sucinta das **proteínas do citoesqueleto**.

O conhecimento das bases moleculares de diversas condições que acometem o músculo progrediu acentuadamente nos últimos anos. A compreensão da base molecular da **distrofia muscular do tipo Duchenne** foi notavelmente ampliada quando se descobriu que a causa residia em mutações no gene que codifica a distrofina (ver relato de caso nº 7 no Capítulo 57). Houve também um progresso significativo na compreensão da base molecular da **hipertermia maligna**, séria complicação que ocorre em alguns pacientes submetidos a certos tipos de anestesia. A **insuficiência cardíaca** é uma condição clínica muito comum, que apresenta uma variedade de causas; seu tratamento equilibrado exige a compreensão da bioquímica do músculo cardíaco. As **miocardiopatias** constituem um grupo de afecções que causam insuficiência cardíaca, algumas das quais geneticamente determinadas. Foi constatado que o NO é um importante regulador do tônus do músculo liso. Muitos **vasodilatadores** amplamente utilizados – como a nitroglicerina, empregada no tratamento da angina de peito – atuam aumentando a formação de NO. O músculo, em parte devido à sua massa, desempenha funções importantes no **metabolismo global** do corpo.

O MÚSCULO É UM TRANSDUTOR DE ENERGIA QUÍMICA EM ENERGIA MECÂNICA

O músculo é o principal **transdutor** (máquina) bioquímico, que converte a energia potencial (química) em energia cinética (mecânica). O músculo, maior tecido individualizado do corpo humano, constitui pouco menos de 25% da massa corporal ao nascimento, mais de 40% no adulto jovem e um pouco menos de 30% no adulto idoso. Serão discutidos certos aspectos dos três tipos de músculos encontrados nos vertebrados: os músculos **esquelético**, **cardíaco** e **liso**. Tanto o músculo esquelético quanto o músculo cardíaco exibem aparência **estriada** ao exame microscópico, enquanto o músculo liso é **não estriado**. Embora o músculo esquelético esteja sob controle nervoso voluntário, o controle dos músculos cardíaco e liso é involuntário.

O sarcoplasma das células contém ATP, creatina fosfato e enzimas glicolíticas

O músculo estriado é composto por fibras musculares multinucleadas, circundadas por uma membrana plasmática eletricamente excitável, o **sarcolema**. Uma fibra muscular individual, que pode estender-se por todo o comprimento do músculo, contém um feixe constituído por numerosas **miofibrilas** dispostas paralelamente, embebidas no líquido intracelular denominado

sarcoplasma. Nesse líquido, há glicogênio; compostos de alta energia ATP e creatina fosfato; e enzimas da glicólise.

O sarcômero é a unidade funcional do músculo

A **Figura 49-1** apresenta uma visão global do músculo voluntário em vários níveis de organização.

Quando a **miofibrila** é examinada à microscopia eletrônica, podem-se observar bandas alternadas claras e escuras (bandas anisotrópicas, que são birrefringentes na luz polarizada, e bandas isotrópicas, significando que não se alteram com a luz polarizada). Por conseguinte, essas bandas são designadas como **bandas A e I**, respectivamente. A região central da banda A (a banda H) aparece menos densa que o resto da banda. A banda I é dividida por uma **linha Z** muito densa e estreita (**Figura 49-2**).

O **sarcômero** é definido como a região compreendida entre duas linhas Z (Figuras 49-1 e 49-2) e que se repete ao longo do eixo de uma fibrila, a distâncias de 1.500 a 2.300 nm, dependendo do estado de contração.

A aparência **estriada** dos músculos voluntário e cardíaco em estudos com microscopia óptica resulta de seu alto grau de organização, em que a maior parte das fibras musculares encontra-se alinhada, de modo que seus sarcômeros ficam em registro paralelo (Figura 49-1).

Os filamentos grossos contêm miosina; os filamentos finos contêm actina, tropomiosina e troponina

Quando examinadas por microscopia eletrônica, as **miofibrilas** aparecem constituídas por dois tipos de filamentos longitudinais. Um tipo, o **filamento grosso**, confinado à banda A, contém principalmente a proteína miosina. Esses filamentos medem cerca de 16 nm de diâmetro e, em corte transversal, dispõem-se em um arranjo hexagonal (Figura 49-2, centro; corte transversal à direita).

O **filamento fino** (com cerca de 7 nm de diâmetro) localiza-se na banda I e estende-se para dentro da banda A, porém sem alcançar a sua zona H (Figura 49-2). Os filamentos finos contêm as proteínas actina, tropomiosina e troponina (**Figura 49-3**). Na banda A, os filamentos finos estão dispostos em torno do filamento grosso (de miosina), formando um arranjo hexagonal secundário. Cada filamento fino situa-se simetricamente entre três filamentos grossos (Figura 49-2, centro, corte transversal central), e cada filamento grosso também é circundado simetricamente por seis filamentos finos.

Os filamentos grossos e finos interagem por meio de **pontes cruzadas**, que emergem a intervalos de 14 nm ao longo dos filamentos grossos. Conforme ilustrado na Figura 49-2, as pontes cruzadas (desenhadas, em cada extremidade dos filamentos de miosina, como pontas de setas, que, no desenho, não se estendem totalmente pelos filamentos finos) apresentam polaridades opostas nas duas extremidades dos filamentos grossos. Os dois polos dos filamentos grossos são separados por um segmento de 150 nm (a banda M, não indicada na figura) que carece de projeções.

O modelo de deslizamento de filamentos com pontes cruzadas constitui o fundamento do pensamento atual acerca da contração muscular

Este modelo foi proposto independentemente na década de 1950 por Henry Huxley e por Andrew Huxley e colaboradores. O modelo baseou-se, em grande parte, em observações morfológicas cuidadosas de músculos em repouso, em extensão e

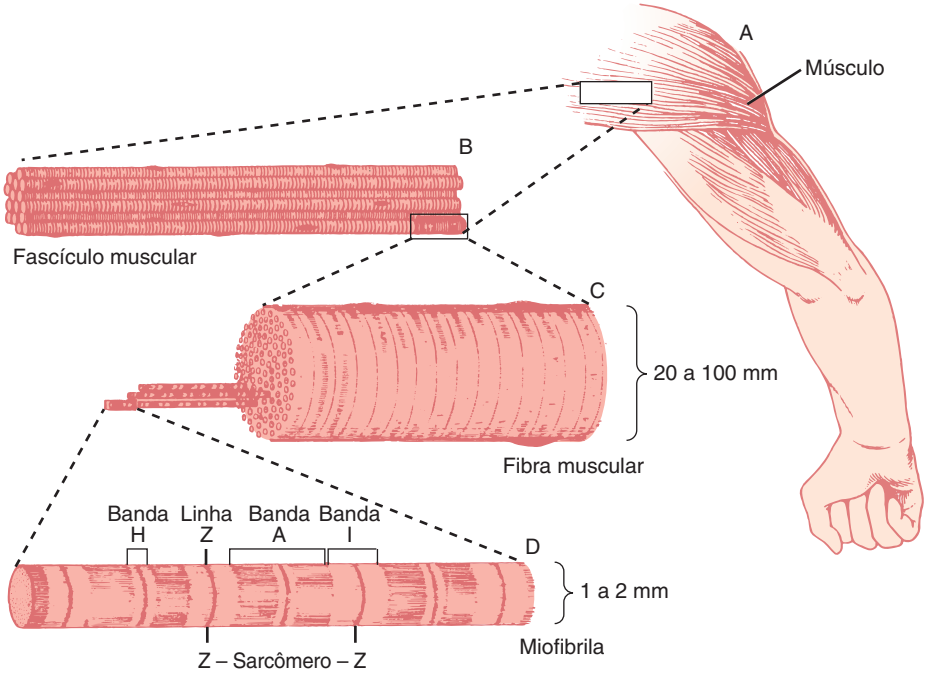


FIGURA 49-1 A estrutura do músculo voluntário. O sarcômero é a região localizada entre as linhas Z. (Desenho de Sylvia Colard Keene. Reproduzido, com autorização, de Bloom W, Fawcett DW: *A Textbook of Histology,* 10th ed. Saunders, 1975.)

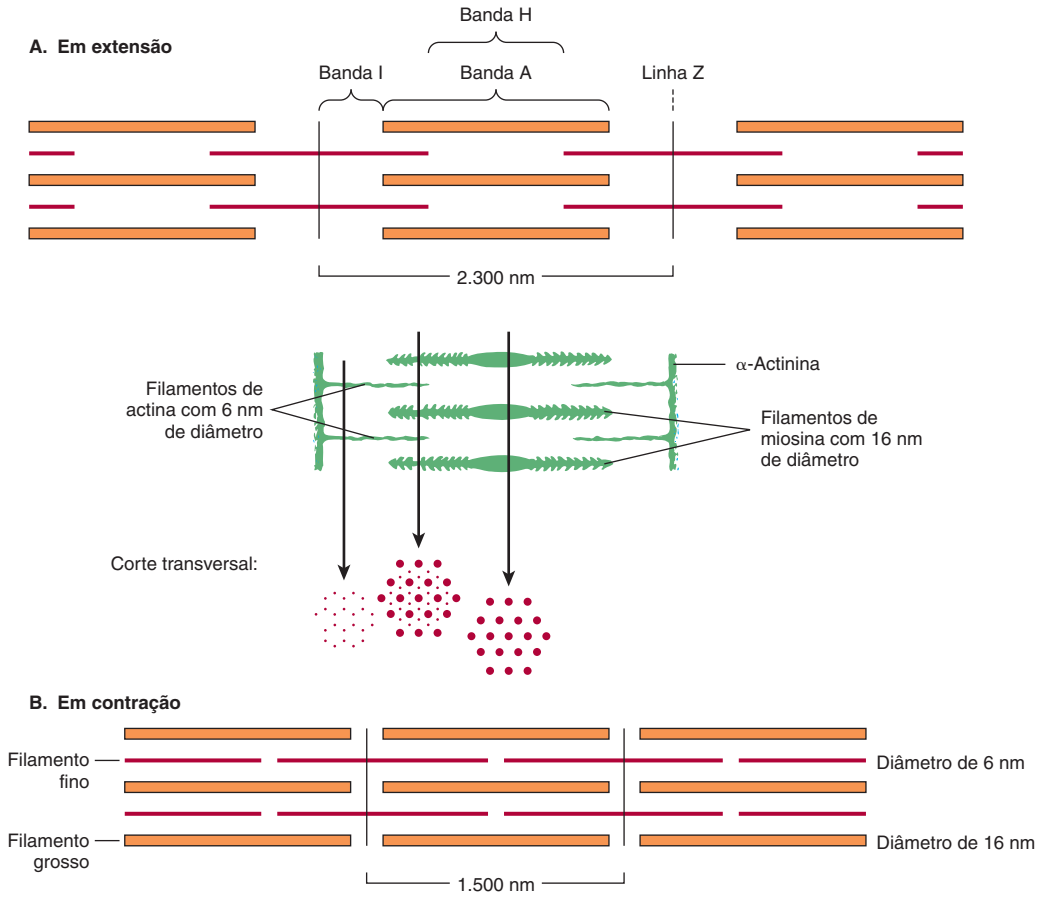


FIGURA 49-2 Arranjo dos filamentos no músculo estriado. (**A**) Em extensão. São mostradas as posições das bandas I, A e H no estado de extensão. Os filamentos finos se sobrepõem parcialmente às extremidades dos filamentos grossos, e os filamentos finos estão ancorados nas linhas Z (frequentemente denominadas discos Z). Na parte inferior da Figura 49-2 (A), há "pontas de flechas" que se originam dos filamentos de miosina (espessos) e apontam em direções opostas. A figura mostra quatro filamentos de actina (finos) ligados a duas linhas Z por meio da α-actinina. A região central dos três filamentos de miosina, que carece de pontas de flechas, é denominada banda M (não indicada). São mostrados cortes transversais feitos através das bandas M, em uma área onde os filamentos de miosina e de actina se sobrepõem e em uma área na qual estão presentes apenas filamentos de actina. (**B**) Em contração. Pode-se observar que os filamentos de actina deslizaram um em direção ao outro ao longo das fibras de miosina. Não houve mudança nos comprimentos dos filamentos grossos (indicados pelas bandas A) e dos filamentos finos (distância entre linhas Z e as bordas adjacentes das bandas H). Entretanto, houve redução no comprimento dos sarcômeros (de 2.300 para 1.500 nm), e os comprimentos das bandas H e I também diminuíram, devido à sobreposição entre os filamentos grossos e finos. Essas observações morfológicas forneceram parte da base para o modelo da contração muscular por deslizamento de filamentos.

em contração. Basicamente, quando o músculo se contrai, não há nenhuma alteração nos comprimentos dos filamentos grossos e finos, porém as zonas H e as bandas I se encurtam (ver legenda da Figura 49-2). Portanto, os arranjos de filamentos interdigitados devem **deslizar uns sobre os outros** durante a contração. As **pontes cruzadas**, que ligam os filamentos grossos e finos em certos estágios do ciclo da contração, geram e sustentam a tensão. A tensão desenvolvida durante a contração muscular é proporcional à sobreposição dos filamentos e à quantidade de pontes cruzadas. Cada cabeça da ponte cruzada está conectada ao filamento grosso por meio de um segmento fibroso flexível, que pode projetar-se para fora do filamento grosso. Esse segmento flexível facilita o contato da cabeça da ponte cruzada com o filamento fino, quando necessário, mas também é maleável o suficiente para se acomodar no espaço entre os filamentos.

A ACTINA E A MIOSINA SÃO AS PRINCIPAIS PROTEÍNAS DO MÚSCULO

A massa de um músculo é constituída de 75% de água e de mais de 20% de proteína. As duas principais proteínas são a actina e a miosina.

A **actina G** monomérica (43 kDa; G de globular) constitui 25% da proteína muscular em peso. Na força iônica fisiológica e na presença de Mg^{2+}, a actina G sofre polimerização não covalente, formando um filamento insolúvel em dupla-hélice, denominado actina F (Figura 49-3). A fibra de **actina F** tem de 6 a 7 nm de espessura e tem um passo ou uma estrutura repetida a cada 35,5 nm.

As **miosinas** constituem uma família de proteínas, e pelo menos 12 classes já foram identificadas no genoma humano. A miosina discutida neste capítulo é a **miosina II**, e, quando se fala

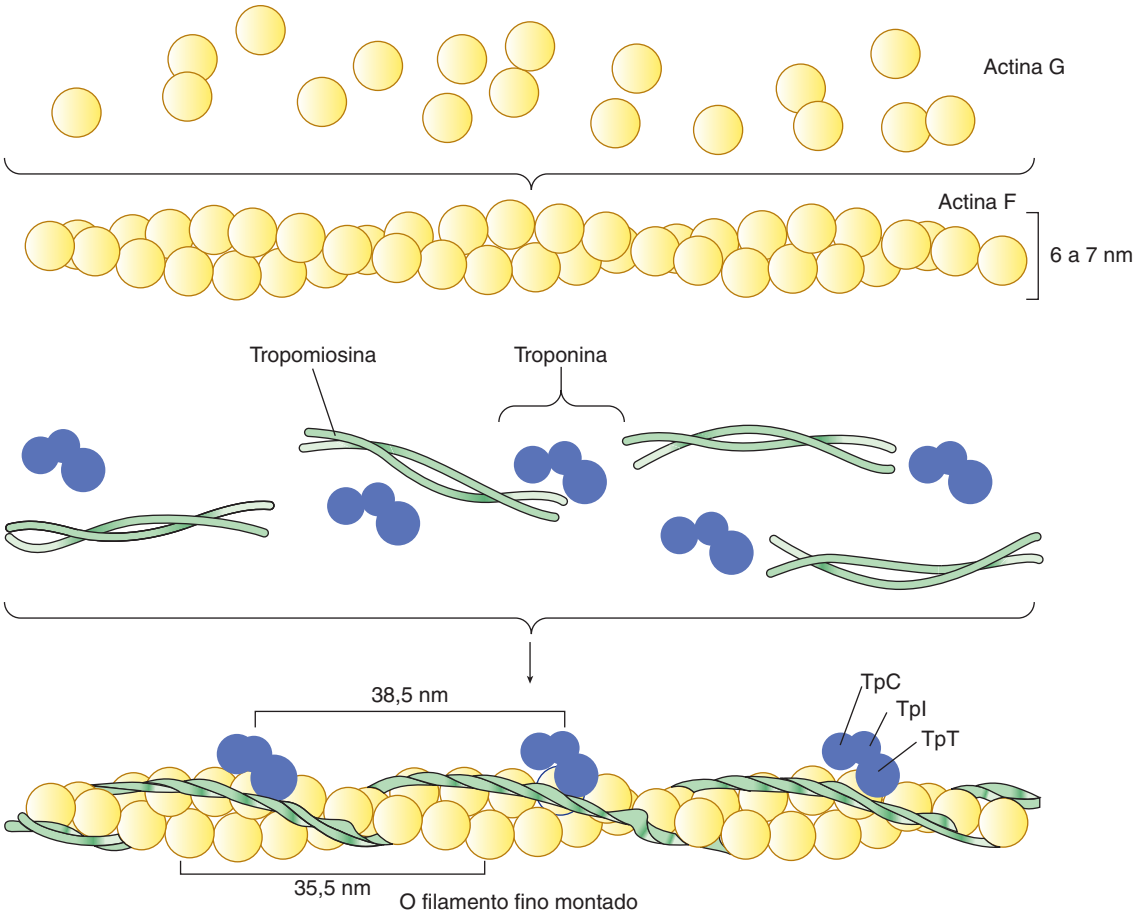


FIGURA 49-3 Representação esquemática do filamento fino, mostrando a configuração espacial de suas três principais proteínas componentes: a actina, a miosina e a tropomiosina. O painel superior mostra as moléculas individuais de actina G. O painel do meio mostra os monômeros de actina montados na actina F. As moléculas individuais de tropomiosina (dois feixes entrelaçados) e de troponina (constituída por suas três subunidades) são também mostradas. O painel inferior mostra o filamento fino montado, que consiste em actina F, tropomiosina e as três subunidades da troponina (TpC, TpI e TpT).

de miosina neste texto, refere-se a essa espécie, a não ser que indicado de outro modo. A miosina I é uma espécie monomérica que se liga às membranas celulares. Pode servir de ligação entre os filamentos e a membrana celular em certos locais.

A **miosina** contribui com 55% da proteína do músculo em peso e forma os **filamentos grossos**. Trata-se de um hexâmero assimétrico, com massa molecular de aproximadamente 460 kDa. A miosina tem cauda fibrosa, que consiste em duas hélices entrelaçadas. Cada hélice apresenta uma porção constituída por uma cabeça globular fixada em uma das extremidades (**Figura 49-4**). O hexâmero consiste em um par de **cadeias pesadas** (**H**), cada qual com massa molecular de aproximadamente 200 kDa, e em dois pares de **cadeias leves** (**L**), cada uma com massa molecular de aproximadamente 20 kDa. As cadeias L diferem entre si: uma delas é denominada cadeia leve **essencial**, enquanto a outra é a cadeia leve **reguladora**. A miosina do músculo esquelético liga-se à actina para formar a **actomiosina** (actina-miosina), e a sua atividade intrínseca de ATPase está acentuadamente aumentada nesse complexo. Existem isoformas da miosina, cuja quantidade pode variar em diferentes situações anatômicas, fisiológicas e patológicas.

As estruturas da actina e da cabeça de miosina foram determinadas por cristalografia por raios X. Esses estudos confirmaram vários achados anteriores relacionados às suas estruturas e que deram origem a muitas informações novas.

A digestão parcial da miosina com proteases ajudou a elucidar a sua estrutura e função

Quando a miosina é digerida pela **tripsina**, são produzidos dois fragmentos de miosina (meromiosinas). A **meromiosina leve** (LMM) consiste em fibras α-helicoidais insolúveis e agregadas provenientes da cauda da miosina (Figura 49-4). A LMM não exibe atividade de ATPase e não se liga à actina F.

A **meromiosina pesada** (HMM; massa molecular de cerca de 340 kDa) é uma proteína solúvel com uma porção fibrosa e uma porção globular (Figura 49-4). Apresenta atividade de **ATPase** e liga-se à actina F. A digestão da HMM com **papaína** gera dois subfragmentos, o S-1 e o S-2. O fragmento S-2 é de natureza fibrosa, carece de atividade de ATPase e não se liga à actina-F.

O fragmento **S-1** (massa molecular de aproximadamente 115 kDa) exibe atividade de ATPase, liga-se às cadeias L e,

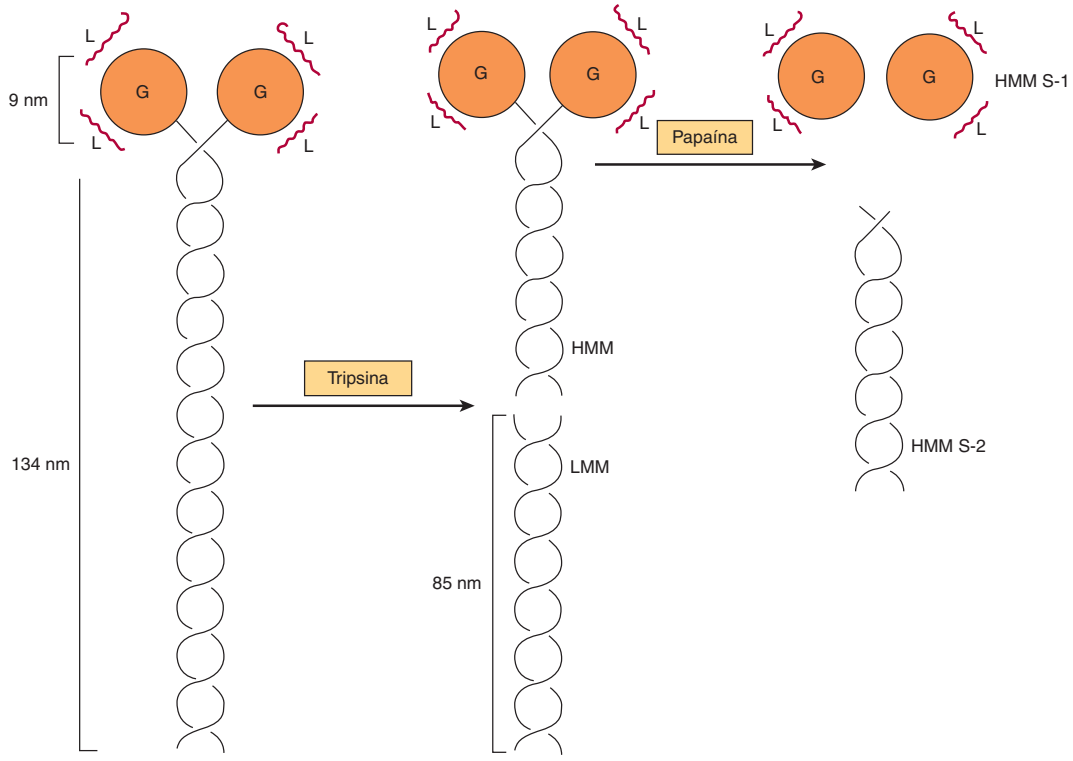


FIGURA 49-4 Diagrama de uma molécula de miosina, mostrando as duas hélices α entrelaçadas (porção fibrosa), a região globular ou da cabeça (G), as cadeias leves (L) e os efeitos da clivagem proteolítica pela tripsina e papaína. A região globular (cabeça da miosina) contém um sítio de ligação da actina e um sítio de ligação de cadeias L e fixa-se também ao restante da molécula de miosina.

na ausência de ATP, liga-se à actina e a decora com "pontas de flecha" (**Figura 49-5**). Tanto o fragmento S-1 quanto a HMM exibem atividade de **ATPase**, que é acelerada em 100 a 200 vezes devido à formação de um complexo com a actina-F. Conforme discutido adiante, a actina-F acelera acentuadamente a velocidade com que a ATPase da miosina libera seus produtos, o ADP e o P_i. Assim, embora a **actina-F** não afete a etapa de hidrólise em si, a sua capacidade de **promover a liberação** dos produtos gerados pela atividade da ATPase acelera intensamente a velocidade global da catálise.

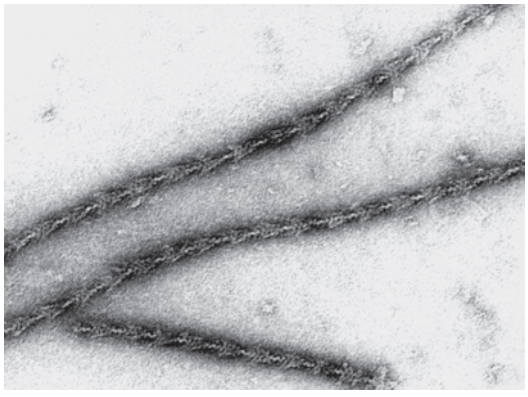


FIGURA 49-5 A decoração dos filamentos de actina com fragmentos S-1 da miosina, formando as "pontas de flecha". (Cortesia de JA Spudich.)

A CONTRAÇÃO MUSCULAR É ACIONADA POR MUDANÇAS NA CONFORMAÇÃO DA CABEÇA DA MIOSINA

Como a hidrólise do ATP pode produzir um movimento macroscópico? A contração muscular consiste essencialmente em **associações e dissociações** cíclicas de S-1 da cabeça da miosina com os filamentos de actina-F. Esse processo também pode ser descrito como a formação e a ruptura de pontes cruzadas. A fixação da actina à miosina é seguida de **mudanças de conformação**, que são particularmente importantes na cabeça S-1 e que dependem do tipo de nucleotídeo presente (ADP ou ATP). Essas alterações resultam no **movimento de força** (*power stroke*), que aciona o movimento dos filamentos de actina ao longo dos filamentos de miosina. A energia necessária para o movimento de força é suprida, em última análise, pelo ATP, que é hidrolisado a ADP e P_i. Entretanto, o próprio movimento de força ocorre como resultado de **mudanças de conformação** na cabeça da miosina, quando o **ADP** a deixa.

Os principais eventos bioquímicos que ocorrem durante um ciclo de contração e relaxamento muscular podem ser representados pelas cinco etapas ilustradas na **Figura 49-6**:

1. Na fase de relaxamento da contração muscular, a cabeça S-1 da miosina hidrolisa o ATP a ADP e P_i, porém estes produtos permanecem ligados. O complexo ADP-P_i-miosina resultante já foi energizado e encontra-se na denominada conformação de alta energia.

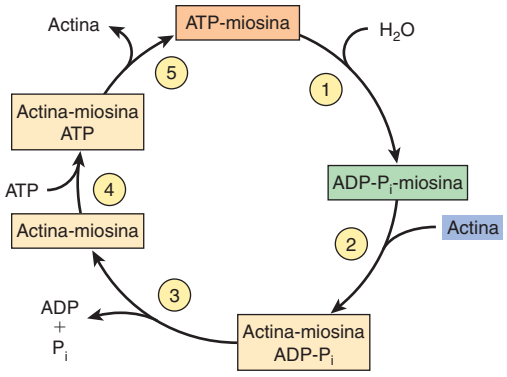


FIGURA 49-6 A hidrólise do ATP aciona o ciclo de associação e dissociação da actina e da miosina em cinco reações descritas no texto. (Modificada, com autorização, de Stryer L: *Biochemistry,* 2nd ed. Freeman, 1981. Copyright © 1981 by W. H. Freeman and Company.)

2. Quando a **contração** do músculo é estimulada (por eventos envolvendo Ca^{2+}, troponina, tropomiosina e actina, que são descritos adiante), a actina torna-se acessível, e a cabeça S-1 da miosina a encontra, liga-se a ela e forma o complexo actina-miosina-ADP-P_i, conforme indicado.
3. A formação desse complexo **promove a liberação de P_i**, iniciando o movimento de força. Esse processo é seguido da liberação do ADP e acompanhado de uma grande mudança de conformação na cabeça da miosina em relação à sua cauda (**Figura 49-7**), tracionando a actina cerca de 10 nm em direção ao centro do sarcômero, no denominado **movimento de força**. Nessa etapa, a miosina encontra-se no denominado estado de baixa energia, indicado como actina-miosina.
4. Outra molécula de ATP liga-se à cabeça S-1, formando um complexo de actina-miosina-ATP.
5. O complexo miosina-ATP apresenta baixa afinidade pela actina, de modo que a actina é liberada. Essa última etapa constitui um componente essencial do relaxamento e depende da ligação do ATP ao complexo de actina-miosina.

Começa então **outro ciclo** com a hidrólise do ATP (etapa 1 da Figura 49-6), produzindo novamente a conformação de alta energia.

Desse modo, a hidrólise do ATP é utilizada para acionar o ciclo, e o real movimento de força é a alteração de conformação da cabeça S-1 que ocorre com a liberação do ADP. As **regiões de dobradiça** da miosina (indicadas como pontos flexíveis em cada extremidade de S-2 na legenda da Figura 49-7) possibilitam a grande amplitude de movimento de S-1, bem como o contato de S-1 com filamentos de actina.

Se houver **queda dos níveis** intracelulares **de ATP** (p. ex., após a morte), não haverá ATP disponível para ligar-se à cabeça S-1 (etapa 4, anteriormente), a **actina não irá se dissociar,** e não irá ocorrer relaxamento (etapa 5). Essa é a explicação para o ***rigor mortis,*** o enrijecimento do corpo que ocorre após a morte.

Os cálculos realizados indicaram que a **eficiência** da contração é de cerca de 50%; a do motor de combustão interna é de menos de 20%.

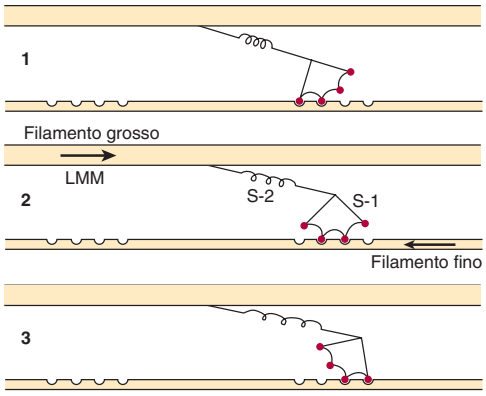


FIGURA 49-7 Representação das pontes cruzadas ativas entre filamentos grossos e finos. Este diagrama foi adaptado por AF Huxley de HE Huxley: the mechanism of muscular contraction Science 1969;164:1356. Este último autor propôs que a força envolvida na contração muscular tem origem em uma tendência da cabeça da miosina (S-1) a sofrer rotação em relação ao filamento fino e é transmitida ao filamento grosso pela porção S-2 da molécula de miosina, que atua como ligação inextensível. Os pontos flexíveis em cada extremidade do segmento S-2 possibilitam a rotação do S-1 e a ocorrência de variações na separação entre os filamentos. Esta figura baseia-se na proposta de HE Huxley, mas também incorpora os elementos elásticos (as espirais na porção S-2) e os elementos de encurtamento sequencial (mostrados, aqui, como quatro sítios de interação entre a porção S-1 e o filamento fino). (Ver Huxley AF, Simmons RM: Proposed mechanism of force generation in striated muscle. Nature [Lond] 1971;233:533.) As forças de ligação dos sítios fixados são maiores na posição 2 do que na posição 1 e maiores na posição 3 do que na posição 2. A cabeça de miosina pode desprender-se da posição 3 com a utilização de uma molécula de ATP; este é o processo predominante observado durante o encurtamento. Verifica-se que a posição da cabeça de miosina varia de cerca de 90º para cerca de 45º, conforme indicado no texto. (S-1, cabeça da miosina; S-2, porção da molécula de miosina; LMM) (ver legenda da Figura 49-4). (Reproduzida de Huxley AF: Muscular contraction. J Physiol 1974;243:1. Por cortesia do autor e do *Journal of Physiology.*)

A tropomiosina e o complexo de troponina presentes nos filamentos finos desempenham funções essenciais no músculo estriado

No músculo estriado, existem duas outras proteínas de menor relevância em termos de massa, porém importantes em termos de sua função. A **tropomiosina** é uma molécula fibrosa, que consiste em duas cadeias, alfa e beta, que se ligam à actina-F no sulco existente entre seus filamentos (Figura 49-3). A tropomiosina é encontrada em todas as estruturas musculares e semelhantes ao músculo. O **complexo de troponina** é exclusivo do músculo estriado e consiste em três polipeptídeos. A **troponina T** (TpT) liga-se à tropomiosina, bem como aos outros dois componentes da troponina. A **troponina I** (TpI) inibe a interação entre a actina-F e a miosina e liga-se também aos outros componentes da troponina. A **troponina C** (TpC) é um polipeptídeo de ligação do cálcio, que é estrutural e funcionalmente análogo à **calmodulina**, importante proteína de ligação do cálcio amplamente distribuída na natureza. Cada molécula de troponina C ou calmodulina liga-se a quatro moléculas de íons cálcio, e ambas as moléculas têm massa molecular de 17 kDa.

O Ca^{2+} desempenha um papel central na regulação da contração muscular

A contração muscular de qualquer origem ocorre pelo mecanismo geral descrito anteriormente. Os músculos de diferentes organismos ou de células e tecidos diferentes dentro de um mesmo organismo podem apresentar mecanismos moleculares distintos responsáveis pela regulação da contração e do relaxamento. Em todos os sistemas, o **Ca^{2+}** desempenha um papel essencial na regulação. Existem dois mecanismos gerais de **regulação** da contração muscular: um mecanismo **com base na actina** e outro **com base na miosina**. O primeiro opera nos músculos esquelético e cardíaco, enquanto o segundo é observado no músculo liso.

A regulação com base na actina ocorre no músculo estriado

A **regulação** do músculo **com base na actina** ocorre nos músculos esquelético e cardíaco dos vertebrados, ambos estriados. No mecanismo geral descrito anteriormente (Figura 49-6), o único fator potencialmente limitante no ciclo de contração muscular poderia ser o ATP. O sistema muscular esquelético é **inibido** em repouso; esta inibição é aliviada para ativar a contração. O inibidor do músculo estriado é o **sistema da troponina**, que está ligado à tropomiosina e à actina-F no filamento fino (Figura 49-3). No músculo estriado, não existe nenhum controle da contração, a não ser que os sistemas tropomiosina-troponina estejam presentes ao longo dos filamentos de actina e miosina. Conforme descrito anteriormente, a **tropomiosina** é encontrada ao longo do sulco da actina-F, e os três componentes da **troponina** – TpT, TpI e TpC – estão ligados ao complexo de actina-F-tropomiosina. A TpI impede a ligação da cabeça da miosina a seu sítio de ligação na actina-F ao alterar a conformação da actina-F por meio das moléculas de tropomiosina, ou simplesmente ao rolar a tropomiosina até uma posição capaz de bloquear diretamente os sítios da actina-F aos quais se ligam as cabeças de miosina. Ambos os processos impedem a ativação da ATPase da miosina, que é mediada pela ligação da cabeça da miosina à actina-F. Por isso, o sistema de TpI bloqueia o ciclo de contração na etapa 2 da Figura 49-6. Esse bloqueio é responsável pelo **estado inibido** do músculo estriado relaxado.

O retículo sarcoplasmático regula os níveis intracelulares de Ca^{2+} no músculo esquelético

No sarcoplasma do músculo em repouso, a concentração de Ca^{2+} é de 10^{-8} a 10^{-7} mol/L. O estado de repouso é obtido pelo bombeamento de Ca^{2+} dentro do retículo sarcoplasmático (RS) por meio da ação de um sistema de transporte ativo, denominado Ca^{2+} ATPase (**Figura 49-8**), que dá início ao relaxamento. O RS consiste em uma rede de sacos membranosos finos. No interior do RS, o Ca^{2+} liga-se a uma proteína específica de ligação de Ca^{2+}, denominada **calsequestrina**. O sarcômero é circundado por uma membrana excitável (o sistema de túbulos T) composta por canais transversos (T) estreitamente associados ao RS.

Quando o sarcolema é excitado por um **impulso nervoso**, o sinal é transmitido ao sistema de túbulos T, e um **canal de liberação de Ca^{2+}**, presente no RS adjacente abre-se, liberando Ca^{2+} do RS para o sarcoplasma. A concentração de Ca^{2+} no sarcoplasma aumenta rapidamente para 10^{-5} mol/L. Os sítios de ligação de Ca^{2+} na TpC no filamento fino são rapidamente ocupados por Ca^{2+}. A TpC-4Ca^{2+} interage com a TpI e a TpT, alterando a sua interação com a tropomiosina. Logo, a tropomiosina sai do caminho ou altera a conformação da actina-F, de modo que a cabeça da miosina-ADP-P_i (Figura 49-6) possa interagir com a actina-F, dando início ao ciclo de contração.

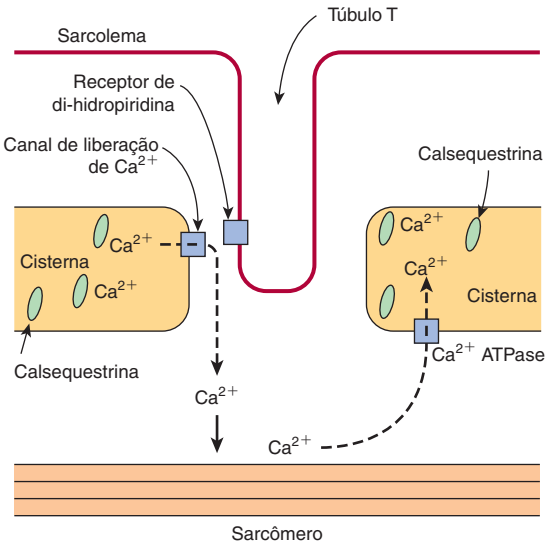


FIGURA 49-8 Diagrama das relações entre o sarcolema (membrana plasmática), um túbulo T e duas cisternas do RS do músculo esquelético (sem escala). O túbulo T estende-se a partir do sarcolema. Uma onda de despolarização, iniciada por um impulso nervoso, é transmitida do sarcolema pelo túbulo T. Em seguida, é conduzida até o canal de liberação de Ca^{2+} (RYR), talvez pela interação entre esse canal e o receptor de di-hidropiridina (canal de voltagem de Ca^{2+} lento), que são mostrados em estreita proximidade. A liberação de Ca^{2+} do canal de liberação de Ca^{2+} no citosol dá início à contração. Em seguida, o Ca^{2+} é bombeado de volta para dentro das cisternas do RS pela Ca^{2+} ATPase (bomba de Ca^{2+}), onde é armazenado, em parte ligado à calsequestrina.

O canal de liberação de Ca^{2+} é também conhecido como **receptor de rianodina** (RYR). Existem duas isoformas desse receptor, RYR1 e RYR2; a primeira é encontrada no músculo esquelético, enquanto a segunda ocorre no músculo cardíaco e no cérebro. A **rianodina** é um alcaloide vegetal que se liga especificamente ao RYR1 e ao RYR2 e modula suas atividades. O canal de liberação de Ca^{2+} é um homotetrâmero constituído de quatro subunidades de 565 kDa. Apresenta sequências transmembranas em sua extremidade carboxiterminal, as quais provavelmente formam o canal de Ca^{2+}. O restante da proteína faz protrusão para o interior do citosol, preenchendo a lacuna entre o RS e a membrana de túbulos transversos. O canal é regulado por ligante, com atuação sinérgica do Ca^{2+} e do ATP *in vitro,* embora não se tenha esclarecido como ele opera *in vivo.* Uma possível sequência de eventos que leva à abertura do canal é mostrada na **Figura 49-9**. O canal situa-se muito próximo do **receptor de di-hidropiridina** (DHPR), canal de cálcio dependente de voltagem do sistema de túbulos transversos (Figura 49-8). Experimentos *in vitro,* que empregaram a cromatografia em coluna de afinidade, indicaram que um segmento de 37 aminoácidos no RYR1 interage com uma alça específica do DHPR.

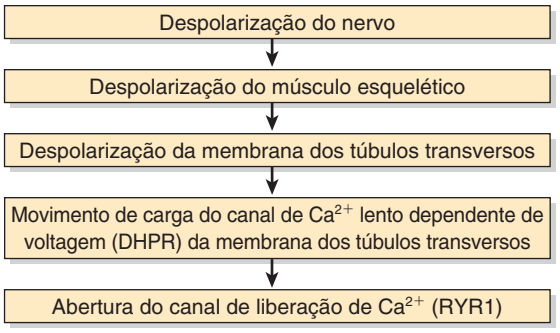


FIGURA 49-9 Possível cadeia de eventos que levam à abertura do canal de liberação de Ca^{2+}. Conforme indicado no texto, foi constatado que o canal de Ca^{2+} dependente de voltagem e o canal de liberação de Ca^{2+} interagem um com o outro *in vitro* por meio de regiões específicas de suas cadeias polipeptídicas. (DHPR, receptor de di-hidropiridina; RYR1, RYR 1.)

Ocorre **relaxamento** quando o Ca^{2+} sarcoplasmático cai abaixo de 10^{-7} mol/L, devido a seu sequestro no RS pela Ca^{2+} ATPase. Por conseguinte, a TpC-4Ca^{2+} perde o seu Ca^{2+}. Em consequência, a **troponina**, por meio de sua interação com a tropomiosina, **inibe** qualquer interação adicional da cabeça da miosina com actina-F, e, na presença de ATP, a cabeça da miosona separa-se da actina-F.

Nessas condições, o Ca^{2+} controla a contração e o relaxamento do músculo esquelético por um mecanismo alostérico mediado pela TpC, TpI, TpT, tropomiosina e actina-F.

Uma **redução** da concentração de **ATP** no sarcoplasma (p. ex., por uso excessivo durante o ciclo de contração-relaxamento ou pela redução de sua formação, como a que pode ocorrer na isquemia) tem dois efeitos importantes: (1) a **Ca^{2+} ATPase** (bomba de Ca^{2+}) no RS deixa de manter a concentração baixa de Ca^{2+} no sarcoplasma. Como consequência, a interação das cabeças de miosina com a actina-F é promovida; (2) não pode ocorrer **separação** dependente de ATP entre as das **cabeças de miosina** e a actina-F, com consequente rigidez (contratura). A condição denominada ***rigor mortis***, que ocorre após a morte, é uma consequência desses eventos.

A contração muscular representa um delicado equilíbrio dinâmico de fixação e separação entre as cabeças de miosina a actina-F, sujeita a regulação fina pelo sistema nervoso.

A **Tabela 49-1** fornece um resumo dos eventos globais da contração e do relaxamento do músculo esquelético.

TABELA 49-1 Sequência de eventos na contração e no relaxamento do músculo esquelético

Etapas da contração
1. Descarga do neurônio motor.
2. Liberação do transmissor (acetilcolina) na placa motora.
3. Ligação da acetilcolina aos receptores nicotínicos de acetilcolina.
4. Aumento da condutância do Na^+ e do K^+ na membrana da placa motora.
5. Geração do potencial de placa motora.
6. Geração de um potencial de ação nas fibras musculares.
7. Disseminação da despolarização ao longo dos túbulos T.
8. Liberação de Ca^{2+} das cisternas terminais do retículo sarcoplasmático e sua difusão para os filamentos grossos e finos.
9. Ligação do Ca^{2+} à troponina C, expondo os sítios de ligação da actina à miosina.
10. Formação de pontes cruzadas entre a actina e a miosina e deslizamento dos filamentos finos sobre os filamentos grossos, produzindo encurtamento.
Etapas do relaxamento
1. O Ca^{2+} é bombeado de volta para o interior do retículo sarcoplasmático.
2. Liberação de Ca^{2+} da troponina.
3. Cessação da interação entre a actina e a miosina.

Fonte: Reproduzida, com autorização, de Ganong WF: *Review of Medical Physiology*, 21 st ed. McGraw-Hill, 2003.

A ocorrência de mutações no gene que codifica o canal de liberação de Ca^{2+} constitui uma causa de hipertermia maligna humana

Alguns pacientes geneticamente predispostos manifestam uma reação grave, denominada **hipertermia maligna** (**HM**), devido à exposição a determinados anestésicos (p. ex., halotano) e relaxantes musculares despolarizantes (p. ex., succinilcolina). A reação consiste principalmente em rigidez dos músculos esqueléticos, hipermetabolismo e febre alta. Um importante fator na gênese da hipertermia maligna consiste na presença de uma **alta concentração citosólica de Ca^{2+}** no músculo esquelético. A menos que a hipertermia maligna seja reconhecida e tratada imediatamente, os pacientes podem morrer por fibrilação ventricular aguda ou sobreviver para depois sucumbir de outras complicações graves. O tratamento apropriado consiste em interromper o anestésico e em administrar **dantroleno** por via intravenosa. O dantroleno é um relaxante muscular esquelético que atua ao inibir a liberação de Ca^{2+} do RS para o citosol, impedindo, assim, o aumento do Ca^{2+} citosólico observado na HM.

A HM também ocorre em **suínos**. Animais homozigotos suscetíveis à HM respondem ao estresse com uma reação fatal (**síndrome do estresse porcino**), semelhante àquela exibida por seres humanos. Se ocorrer antes do abate, a reação afeta adversamente a qualidade da carne do porco, resultando em um produto inferior. Ambos os eventos podem resultar em consideráveis perdas econômicas para a indústria de suínos.

O achado de níveis citosólicos elevados de Ca^{2+} no músculo na HM sugeriu que a condução poderia ser causada por anormalidades da Ca^{2+} ATPase ou do **canal de liberação de Ca^{2+}**. Não foi detectada nenhuma anormalidade na primeira; entretanto, o sequenciamento do cDNA para esta última proteína demonstrou ser esclarecedor, particularmente nos suínos. Todos os cDNAs de **suínos** com HM até hoje examinados apresentam uma substituição de C1843 por T, resultando na substituição de Cys por Arg^{615} no canal de liberação de Ca^{2+}. A mutação afeta a função do canal,

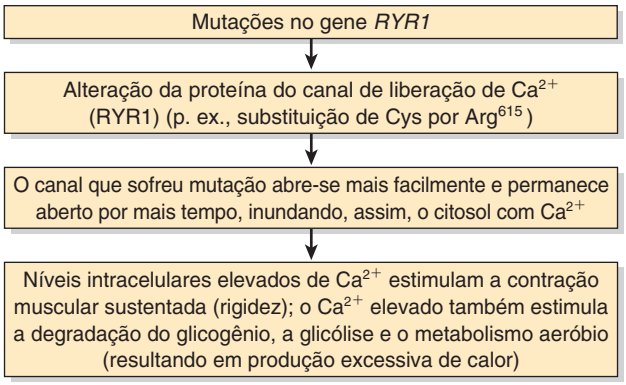


FIGURA 49-10 Esquema simplificado da etiologia da hipertermia maligna (OMIM 145600). Muitas mutações pontuais diferentes foram detectadas no gene *RYR1*, algumas das quais estão associadas à doença do cerne central (OMIM 117000). Estima-se que pelo menos 50% das famílias com membros que apresentam hipertermia maligna tenham uma ligação com o gene *RYR1*. Foram também detectados alguns indivíduos com mutações no gene que codifica o DHPR; é possível que também sejam encontradas mutações em outros genes para proteínas envolvidas em determinados aspectos do metabolismo muscular.

de modo que ele passa a se abrir mais facilmente e a permanecer aberto por mais tempo. O resultado final consiste na liberação maciça de Ca^{2+} no citosol, causando, em última análise, contração muscular sustentada.

O quadro é mais complexo nos **seres humanos,** visto que a HM exibe **heterogeneidade genética**. Os membros de várias famílias que sofrem de hipertermia maligna não demonstraram nenhuma ligação genética com o gene *RYR1*. Foi constatado que alguns seres humanos suscetíveis à HM exibem a mesma mutação encontrada nos suínos, enquanto outros apresentam várias mutações pontuais em diferentes *loci* do gene *RYR1*. Foi descoberto que certas famílias com HM apresentam mutações que afetam o **DHPR**. É possível que as mutações que afetam outras proteínas musculares, como a **calsequestrina-1**, proteína de ligação do Ca^{2+} do RS que modula a função do RyR1, também possam causar HM. A **Figura 49-10** fornece um resumo da provável cadeia de eventos que ocorre na hipertermia maligna. A perspectiva mais promissora desses achados é que, uma vez detectadas mutações adicionais, será possível proceder à **triagem**, utilizando sondas de DNA apropriadas, de indivíduos com risco de desenvolver HM durante a anestesia. Os testes atuais de triagem (p. ex., o teste com cafeína-halotano *in vitro*) são relativamente pouco confiáveis. Os indivíduos acometidos poderiam então receber **anestésicos alternativos** que não representassem risco de vida. Também deveria ser possível, se desejado, eliminar a HM das populações suínas por meio de práticas adequadas de cruzamento.

Outra condição causada por mutações no gene *RYR1* é a **doença do cerne central**. Trata-se de uma miopatia rara que surge na lactância, com hipotonia e fraqueza muscular proximal. A microscopia eletrônica revela ausência de mitocôndrias no centro de numerosas fibras musculares tipo I (ver adiante). A lesão das mitocôndrias, induzida por níveis intracelulares elevados de Ca^{2+} em consequência do funcionamento anormal do *RYR1*, parece ser responsável pelos achados morfológicos.

TABELA 49-2 Algumas outras proteínas importantes no músculo

Proteína	Localização	Comentário ou função
Titina	Estende-se da linha Z até a linha M	É a maior proteína do corpo. Desempenha um papel no relaxamento do músculo.
Nebulina	A partir da linha Z, ao longo do comprimento dos filamentos de actina	Pode regular a montagem e o comprimento dos filamentos de actina.
α-Actinina	Ancora a actina às linhas Z	Estabiliza os filamentos de actina.
Desmina	Situa-se ao longo dos filamentos de actina	Liga-se à membrana plasmática (plasmalema).
Distrofina	Ligada ao plasmalema	Deficiente na distrofia muscular de Duchenne. A ocorrência de mutações de seu gene também pode causar miocardiopatia dilatada.
Calcineurina	Citosol	Uma proteína fosfatase regulada por calmodulina. Pode desempenhar papéis importantes na hipertrofia cardíaca e na regulação da quantidade de fibras de contração lenta e rápida no músculo.
Proteína C de ligação da miosina	Distribuição transversal nas bandas A do sarcômero	Liga-se à miosina e à titina. Desempenha um papel na manutenção da integridade estrutural do sarcômero.

A OCORRÊNCIA DE MUTAÇÕES NO GENE QUE CODIFICA A DISTROFINA PROVOCA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

Várias outras **proteínas** desempenham diversos papéis na estrutura e na função do músculo. Essas proteínas incluem a titina (a maior proteína conhecida), a nebulina, a α-actinina, a desmina, a distrofina e a calcineurina. A **Tabela 49-2** fornece um resumo de algumas propriedades dessas proteínas.

A **distrofina** é de interesse especial. Conforme discutido no caso nº 9 do Capítulo 57, foi constatado que a ocorrência de mutações no gene que codifica essa proteína constitui a causa da **distrofia muscular de Duchenne** e da **distrofia muscular de Becker** menos grave. Essas mutações também estão implicadas em alguns casos de **miocardiopatia dilatada** (ver adiante). Como mostra a **Figura 49-11**, a distrofina faz parte de um grande complexo de proteínas que se ligam ao plasmalema ou que interagem com ele. A distrofina liga o citoesqueleto de actina à MEC e parece ser necessária para a montagem da junção sináptica. Acredita-se que o comprometimento desses processos pela formação de distrofina defeituosa seja crucial na etiologia da distrofia muscular de Duchenne. Certas mutações nos genes que codificam alguns dos componentes do **complexo de sarcoglicanos** mostrado na Figura 49-11 são responsáveis pela distrofia do

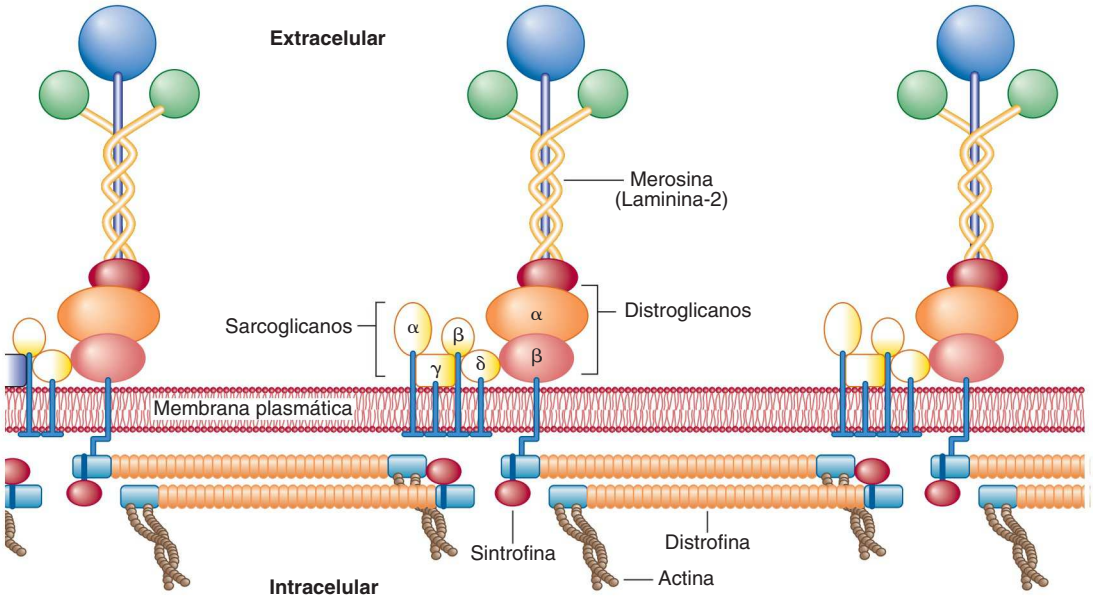


FIGURA 49-11 Organização da distrofina e de outras proteínas em relação à membrana plasmática das células musculares. A distrofina faz parte de um grande complexo oligomérico associado a vários outros complexos proteicos. O complexo de distroglicano consiste em α-distroglicano, que se associa à merosina, uma proteína da lâmina basal (também denominada laminina-2, ver Capítulo 48), e em β-distroglicano, que se liga ao α-distroglicano e à distrofina. A sintrofina liga-se à extremidade carboxiterminal da distrofina. O complexo de sarcoglicano consiste em quatro proteínas transmembranas: α, β, γ e δ sarcoglicano. A função do complexo sarcoglicano e a natureza das interações dentro do complexo e entre ele e outros complexos não estão bem esclarecidas. O complexo sarcoglicano é formado apenas no músculo estriado, e as suas subunidades associam-se preferencialmente entre si, sugerindo que o complexo pode funcionar como uma única unidade. Mutações no gene que codifica a distrofina causam distrofia muscular de Duchenne e de Becker. Foi constatado que a ocorrência de mutações nos genes que codificam os vários sarcoglicanos é responsável pelas distrofias do cíngulo dos membros (p. ex., OMIM 604286), enquanto mutações nos genes que codificam outras proteínas musculares causam outros tipos de distrofia muscular. As mutações nos genes que codificam determinadas glicosiltransferases envolvidas na síntese das cadeias de glicano do α-distroglicano são responsáveis por certas distrofias musculares congênitas (ver Capítulo 47). (Reproduzida, com autorização, de Duggan DJ et al: Mutations in the sarcoglycan genes in patients with myopathy. N Engl J Med 1997;336:618. Copyright © 1997 Massachusetts Medical Society. Todos os direitos reservados.)

cíngulo dos membros e algumas **outras formas congênitas** de distrofia muscular.

Foi demonstrado que mutações nos genes que codificam **várias glicosiltransferases** envolvidas na síntese das cadeias de açúcar dos **α-distroglicanos** constituem a causa de certos tipos de **distrofia muscular congênita** (ver Capítulo 47).

O MÚSCULO CARDÍACO ASSEMELHA-SE, EM MUITOS ASPECTOS, AO MÚSCULO ESQUELÉTICO

O quadro geral da contração muscular no coração assemelha-se ao do músculo esquelético. O músculo cardíaco, à semelhança do músculo esquelético, é **estriado** e utiliza o sistema de actina-miosina-tropomiosina-troponina descrito anteriormente. Diferentemente do músculo esquelético, o músculo cardíaco exibe **ritmicidade intrínseca**, e os miócitos individuais comunicam-se uns com os outros em virtude de sua natureza sincicial. O **sistema tubular T** está mais desenvolvido no músculo cardíaco, embora o **RS** seja menos extenso, e, consequentemente, haja um menor suprimento intracelular de Ca^{2+} para a contração. Portanto, o músculo cardíaco depende do **Ca^{2+} extracelular** para a sua contração; se for privado de Ca^{2+}, o músculo cardíaco isolado cessa de bater em aproximadamente 1 min, enquanto o músculo esquelético pode continuar a se contrair por um maior período de tempo na ausência de uma fonte extracelular de Ca^{2+}. O **AMP cíclico** desempenha um papel mais proeminente no músculo cardíaco do que no músculo esquelético. O AMP cíclico modula os níveis intracelulares de Ca^{2+} pela ativação de proteínas quinases; essas enzimas fosforilam várias proteínas de transporte no sarcolema e no RS, bem como no complexo regulador de troponina-tropomiosina, afetando os níveis intracelulares de Ca^{2+} ou a resposta a eles. Existe uma correlação aproximada entre a fosforilação da TpI e o aumento da contração do músculo cardíaco induzido pelas catecolaminas. Isso pode explicar os **efeitos inotrópicos** (aumento da contratilidade) dos compostos β-adrenérgicos sobre o coração. A **Tabela 49-3** fornece um resumo de algumas diferenças entre os músculos esquelético, cardíaco e liso.

O Ca^{2+} entra nos miócitos pelos canais de Ca^{2+} e sai deles por meio do trocador de Na^{+}-Ca^{2+} e da Ca^{2+} ATPase

Conforme já assinalado, o **Ca^{2+} extracelular** desempenha um importante papel na contração do músculo cardíaco, mas não na do músculo esquelético. Isso significa que o Ca^{2+} entra nos mió-

TABELA 49-3 Algumas diferenças entre os músculos esquelético, cardíaco e liso

Músculo esquelético	Músculo cardíaco	Músculo liso
1. Estriado	**1.** Estriado	**1.** Não estriado
2. Sem sincício	**2.** Sincicial	**2.** Sincicial
3. Túbulos T pequenos	**3.** Túbulos T grandes	**3.** Em geral, túbulos T rudimentares
4. Retículo sarcoplasmático bem desenvolvido e bomba de Ca^{2+} que atua rapidamente.	**4.** Retículo sarcoplasmático presente e bomba de Ca^{2+} que atua de modo relativamente rápido.	**4.** Retículo sarcoplasmático geralmente rudimentar e bomba de Ca^{2+} que atua lentamente.
5. O plasmalema carece de muitos receptores de hormônios.	**5.** O plasmalema contém uma variedade de receptores (p. ex., α-e β-adrenérgicos)	**5.** O plasmalema contém uma variedade de receptores (p. ex., α-e β-adrenérgicos)
6. O impulso nervoso dá início à contração.	**6.** Apresenta ritmicidade intrínseca.	**6.** A contração é iniciada por impulsos nervosos, hormônios, etc.
7. O Ca^{2+} do líquido extracelular não é importante para a contração.	**7.** O Ca^{2+} do líquido extracelular é importante para a contração.	**7.** O Ca^{2+} do líquido extracelular é importante para a contração.
8. Presença do sistema de troponina.	**8.** Presença do sistema de troponina.	**8.** Carece de um sistema de troponina; utiliza a cabeça reguladora da miosina.
9. A caldesmona não está envolvida.	**9.** A caldesmona não está envolvida.	**9.** A caldesmona é uma proteína reguladora importante.
10. Ciclos muito rápidos das pontes cruzadas.	**10.** Ciclos relativamente rápidos das pontes cruzadas.	**10.** Ciclos lentos das pontes cruzadas, possibilitando uma contração lenta e prolongada e menor utilização de ATP.

citos e sai deles de modo regulado. Serão consideradas, de modo sucinto, três proteínas transmembranas que desempenham um papel nesse processo.

Canais de Ca^{2+}

O Ca^{2+} entra nos miócitos por estes canais, que possibilitam apenas a entrada de íons Ca^{2+}. A principal porta de entrada é o canal de tipo L (corrente de longa duração, grande condutância) ou canal **lento de Ca^{2+}**, que é regulado por voltagem, abrindo-se durante a despolarização induzida pela propagação do potencial de ação cardíaco e fechando-se quando o potencial de ação declina. Esses canais são equivalentes aos receptores de di-hidropiridina do músculo esquelético (Figura 49-8). Os canais lentos de Ca^{2+} são **regulados** por proteínas quinases dependentes de AMPc (estimuladoras) e por proteínas quinases dependentes de GMPc (inibitórias), enquanto são bloqueados pelos denominados bloqueadores dos canais de cálcio (p. ex., verapamil). Os canais **rápidos** de Ca^{2+} (ou T, de transitórios) também estão presentes no plasmalema, embora em quantidades muito menores; esses canais provavelmente contribuem para a fase precoce do aumento do Ca^{2+} mioplasmático.

O aumento resultante do Ca^{2+} no mioplasma atua sobre o canal de liberação de Ca^{2+} do RS, induzindo a sua abertura. Esse processo é denominado **liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+}** (CICR). Estima-se que aproximadamente 10% do Ca^{2+} envolvido na contração entrem no citosol a partir do líquido extracelular, enquanto 90% provêm do RS. Entretanto, os primeiros 10% são relevantes, visto que a taxa de aumento de Ca^{2+} no mioplasma é importante, e a entrada pelos canais de Ca^{2+} tem uma contribuição considerável.

Trocador de Ca^{2+}-Na^{+}

Trata-se da principal via de **saída** do Ca^{2+} dos miócitos. Nos miócitos em repouso, esse trocador ajuda a manter um baixo nível intracelular de Ca^{2+} livre, trocando um Ca^{2+} por três Na^{+}. A energia para o movimento ascendente do Ca^{2+} fora da célula provém do movimento descendente do Na^{+} plasmático para dentro da célula. Essa troca contribui para o relaxamento, mas pode ocorrer na direção oposta durante a excitação. Devido ao trocador de Ca^{2+}-Na^{+}, qualquer fator que produzir elevação do Na^{+} intracelular (Na^{+}_{i}) irá secundariamente elevar o Ca^{2+}_{i}, aumentando a força da contração. Esse processo é designado como **efeito inotrópico positivo**. Um exemplo é o que ocorre quando o fármaco **digitálico** é usado no tratamento da insuficiência cardíaca. Os digitálicos inibem a Na^{+}-K^{+}-ATPase do sarcolema, diminuindo a saída de Na^{+} e aumentando, portanto, o Na^{+}_{i}. Isso, por sua vez, causa elevação do Ca^{2+} por intermédio do trocador de Ca^{2+}-Na^{+}. O aumento do Ca^{2+}_{i} resulta em maior força da contração cardíaca (ver **Figura 49-12**), que tem efeito benéfico na insuficiência cardíaca.

Ca^{2+} ATPase

Essa bomba de Ca^{2+}, situada no sarcolema, também contribui para a saída de **Ca^{2+}**, porém acredita-se que ela desempenha um papel relativamente menor em comparação com o trocador de Ca^{2+}-Na^{+}.

Deve-se assinalar que existe uma variedade de **canais iônicos** (Capítulo 40) na maioria das células para o Na^{+}, o K^{+}, o Ca^{2+}, etc. Nos últimos anos, muitos desses canais foram clonados, e foram estabelecidas as suas disposições em suas respectivas membranas (número de vezes que cada um atravessa a membrana, localização do sítio efetivo de transporte iônico na proteína, etc.) Esses canais podem ser classificados conforme indicado na **Tabela 49-4**. O músculo cardíaco é rico em canais iônicos, e esses canais também são importantes no músculo esquelético. Foi constatado que mutações dos genes que codificam os canais iônicos são responsáveis por algumas condições relativamente raras que acometem o músculo. Essas condições e outras doenças causadas por mutações de canais iônicos foram denominados **canalopatias**. Algumas dessas canalopatias estão listadas na **Tabela 49-5**.

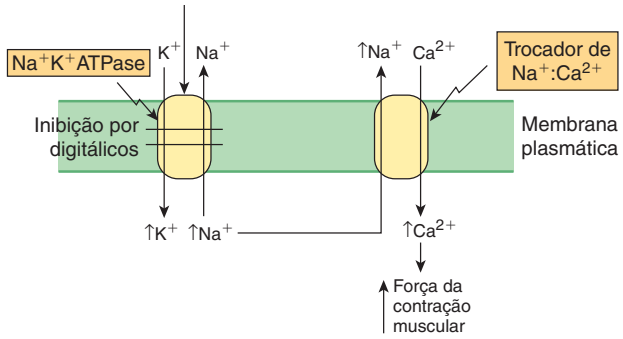


FIGURA 49-12 Esquema mostrando como o fármaco digitálico (usado no tratamento de certos casos de insuficiência cardíaca) aumenta a contração cardíaca. Os digitálicos inibem a Na^+-K^+-ATPase (ver Capítulo 40). Isto resulta em menor quantidade de Na^+ bombeada para fora do miócito cardíaco e leva a um aumento da concentração intracelular de Na^+. Por sua vez, isso estimula o trocador de Na^+-Ca^{2+}, de modo que ocorre maior troca de Na^{2+} para fora, enquanto uma maior quantidade de Ca^{2+} entra nos miócitos. A consequente elevação da concentração intracelular de Ca^{2+} aumenta a força da contração muscular.

As miocardiopatias hereditárias são atribuídas aos distúrbios do metabolismo energético cardíaco ou a proteínas miocárdicas anormais

Uma **miocardiopatia hereditária** refere-se a qualquer anormalidade estrutural ou funcional do miocárdio ventricular, devido a uma causa hereditária. Existem tipos não hereditários de miocardiopatia, porém esses casos não serão descritos aqui. Como mostra a **Tabela 49-6**, as causas das miocardiopatias hereditárias dividem-se em duas grandes classes: (1) distúrbios do **metabolismo energético cardíaco**, refletindo principalmente mutações dos genes que codificam enzimas ou proteínas envolvidas na oxidação de ácidos graxos (uma importante fonte de energia para o miocárdio) e na fosforilação oxidativa; e (2) mutações em genes que codificam proteínas envolvidas ou que **afetam a contração do miocárdio**, como a miosina, a tropomiosina, as troponinas e a proteína C cardíaca de ligação da miosina. A ocorrência de mutações nos genes que codificam essas últimas proteínas provoca miocardiopatia hipertrófica familiar, que será discutida aqui.

TABELA 49-4 Principais tipos de canais iônicos encontrados nas células

Tipo	Comentário
Regulado por ligante externo	Abrem-se em resposta a uma molécula extracelular específica, como, por exemplo, acetilcolina.
Regulado por ligante interno	Abrem-se ou fecham-se em resposta a uma molécula intracelular específica, como, por exemplo, um nucleotídeo cíclico.
Regulado por voltagem	Abrem-se em resposta a uma mudança no potencial de membrana, como, p. ex., canais de Na^+, K^+ e Ca^{2+} no coração.
Regulado mecanicamente	Abrem-se em resposta a uma mudança de pressão mecânica.

TABELA 49-5 Alguns distúrbios (canalopatias) devidos a mutações dos genes que codificam polipeptídeos constituintes dos canais iônicos

Distúrbio[1]	Canal iônico e principais órgãos envolvidos
Doença do núcleo central (OMIM 117000)	Canal de liberação de Ca^{2+} (RYR1) Músculo esquelético
Paralisia periódica hipercalêmica (OMIM 170500)	Canal de sódio Músculo esquelético
Paralisia periódica hipocalêmica (OMIM 170400)	Canal de Ca^{2+} lento dependente de voltagem (DHPR) Músculo esquelético
Hipertermia maligna (OMIM 145600)	Canal de liberação de Ca^{2+} (RYR1) Músculo esquelético
Miotonia congênita (OMIM 160800)	Canal de cloreto Músculo esquelético

Fonte: Dados obtidos, em parte, de Ackerman NJ, Clapham DE: Íon channels – basic science and clinical disease. N Engl J Méd 1997;336:1575.
[1]Outras canalopatias incluem a síndrome do QT longo (OMIM 192500); o pseudoaldosteronismo (síndrome de Liddle, OMIM 177200); a hipoglicemia hiperinsulinêmica persistente do lactente (OMIM 601820); a nefrolitíase hereditária recessiva ligada ao X do tipo II do lactente (síndrome de Dent, OMIM 300009); e a miotonia generalizada recessiva (doença de Becker, OMIM 255700). O termo "miotonia" refere-se a qualquer condição em que não há relaxamento dos músculos após a sua contração.

As mutações no gene da cadeia pesada da β-miosina cardíaca constituem uma causa de miocardiopatia hipertrófica familiar

A miocardiopatia hipertrófica familiar é uma das doenças cardíacas hereditárias mais frequentes. Os pacientes apresentam hipertrofia—frequentemente maciça – de um ou de ambos os ventrículos desde o início da vida, que não está relacionada a qualquer causa extrínseca, como hipertensão arterial. Os casos são transmitidos, em sua

TABELA 49-6 Causas bioquímicas de miocardiopatias hereditárias

Causa	Proteínas ou processo afetado
Erros inatos da oxidação de ácidos graxos	Entrada de carnitina nas células e mitocôndria Certas enzimas da oxidação de ácidos graxos
Doenças da fosforilação oxidativa mitocondrial	Proteínas codificadas por genes mitocondriais Proteínas codificadas por genes nucleares
Anormalidades de proteínas contráteis e estruturais	Cadeias pesadas da β-miosina, troponina, tropomiosina, distrofina

Fonte: Baseado em Kelly, DP, Strauss A W: Inherited cardiomyopathies. N Engl J Med 1994; 330:913.
[1] Mutações (p. ex., mutações pontuais, ou em alguns casos deleções) nos genes (nucleares ou mitocondriais) que codificam diversas proteínas, enzimas, ou moléculas de tRNA são as causas principais de miocardiopatias hereditárias. Algumas condições são moderadas, enquanto que outras são graves e podem ser parte de alguma síndrome que afeta outros tecidos.

maioria, de modo autossômico dominante; o restante é esporádico. Até recentemente, a causa era desconhecida. Entretanto, esta situação mudou quando estudos de uma família acometida mostraram que uma **mutação de sentido incorreto** (i.e., substituição de um aminoácido por outro) no **gene da cadeia pesada da β-miosina** era responsável pela condição. Estudos subsequentes demonstraram a ocorrência de um certo número de mutações de sentido incorreto nesse gene, codificando, todas elas, resíduos altamente conservados. Alguns indivíduos apresentaram outras mutações, como a formação de um gene híbrido para uma cadeia pesada de α/β-miosina. Os pacientes com miocardiopatia hipertrófica familiar podem exibir grande variação no seu quadro clínico. Isso reflete, em parte, a **heterogeneidade genética,** isto é, a mutação de vários **outros genes** (p. ex., os que codificam a actina cardíaca, a tropomiosina, as troponinas cardíacas I e T, as cadeias leves essenciais e reguladoras da miosina, a proteína C cardíaca de ligação da miosina, a titina e a tRNA-glicina e tRNA-isoleucina mitocondriais) também pode causar miocardiopatia hipertrófica familiar. Além disso, mutações em diferentes locais do gene para a cadeia pesada da β-miosina podem afetar, em maior ou menor grau, a função da proteína. As mutações de sentido incorreto agrupam-se nas regiões da cabeça e da cabeça-haste da cadeia pesada da miosina. Uma hipótese aventada é a de que os polipeptídeos mutantes ("polipeptídeos venenos") determinam a formação de miofibrilas anormais, resultando finalmente em hipertrofia compensatória. Algumas mutações alteram a **carga** do aminoácido (p. ex., substituição de uma glutamina por arginina), afetando presumivelmente a **conformação** da proteína de modo mais acentuado e, assim, a sua função. Os pacientes portadores dessas mutações apresentam expectativa de vida significativamente mais curta que a dos pacientes nos quais a mutação não produziu nenhuma alteração de carga. Assim, a definição das mutações precisas envolvidas na gênese das MHF pode ter um importante valor prognóstico; pode ser obtida pelo uso apropriado da reação em cadeia da polimerase no DNA genômico de uma amostra de linfócitos do sangue. A **Figura 49-13** fornece um esquema simplificado dos eventos que causam miocardiopatia hipertrófica familiar.

Outro tipo de miocardiopatia é denominado **miocardiopatia dilatada**. Mutações dos genes que codificam a distrofina, a proteína LIM do músculo (assim denominada por ter sido comprovada a presença de um domínio rico em cisteína, originalmente detectado em três proteínas: Lin-II, Isl-1 e Mec-3), a proteína de ligação do elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB), a desmina e a lamina foram implicadas como causa dessa condição. As primeiras duas proteínas ajudam a organizar o aparelho contrátil das células do músculo cardíaco, enquanto a CREB está envolvida na regulação de alguns genes nessas células. As pesquisas atuais não apenas estão elucidando as causas moleculares das miocardiopatias, como também estão identificando mutações que causam **distúrbios do desenvolvimento cardíaco** (p. ex., defeitos septais) e **arritmias** (p. ex., devido a mutações que afetam os canais iônicos).

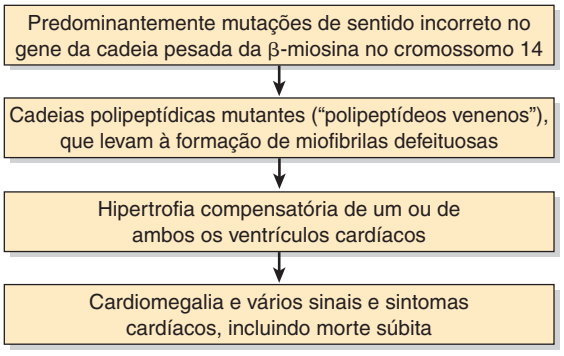


FIGURA 49-13 Esquema simplificado das causas da miocardiopatia hipertrófica familiar (OMIM 192600) devido a mutações no gene que codifica a cadeia pesada da β-miosina. Mutações nos genes que codificam outras proteínas (ver o texto) também podem causar esse distúrbio.

O Ca^{2+} também regula a contração do músculo liso

Embora todos os músculos contenham actina, miosina e tropomiosina, apenas os músculos **estriados** dos vertebrados contêm o **sistema de troponina**. Desse modo, os mecanismos que regulam a contração devem diferir em vários sistemas contráteis.

Os **músculos lisos** possuem estruturas moleculares semelhantes àquelas dos músculos estriados, porém os sarcômeros não estão alinhados de modo a produzir uma aparência estriada. Os músculos lisos contêm moléculas de α-actinina e de tropomiosina, assim como os músculos esqueléticos. O músculo liso **carece de sistema de troponina**, e as cadeias leves das moléculas de miosina dos músculos lisos diferem daquelas da miosina do músculo estriado. A regulação da contração do músculo liso baseia-se na miosina, diferentemente do músculo estriado, cuja regulação é baseada na actina. Todavia, à semelhança do músculo estriado, a contração do músculo liso é **regulada pelo Ca^{2+}**.

A fosforilação das cadeias leves de miosina dá início à contração do músculo liso

Quando a miosina do músculo liso liga-se à actina-F na ausência de outras proteínas musculares, como a tropomiosina, **não há nenhuma atividade detectável de ATPase**. Essa ausência de atividade é bem diferente da situação descrita para a miosina e a actina F do músculo estriado, que apresenta atividade abundante de ATPase. A miosina do músculo liso contém **cadeias leves** que impedem a ligação da cabeça da miosina à actina-F; elas **precisam ser fosforiladas** antes que permitam a ativação da ATPase da miosina pela actina-F. A atividade de ATPase então alcançada hidrolisa o ATP cerca de 10 vezes mais lentamente do que a atividade correspondente no músculo esquelético. O fosfato presente nas cadeias leves de miosina pode formar um quelato com o Ca^{2+} ligado ao complexo tropomiosina-TpC-actina, levando a uma maior taxa de formação de pontes cruzadas entre as cabeças de miosina e a actina. A fosforilação das cadeias leves dá **início** ao ciclo de associação-dissociação da contração do músculo liso.

A quinase da cadeia leve da miosina é ativada pela calmodulina-$4Ca^{2+}$ e, em seguida, fosforila as cadeias leves

O sarcoplasma do músculo liso contém uma **quinase da cadeia leve da miosina**, que é dependente de cálcio. A ativação da quinase da cadeia leve de miosina pelo Ca^{2+} requer a ligação da **calmodulina-$4Ca^{2+}$** à sua subunidade quinase (**Figura 49-14**). A quinase

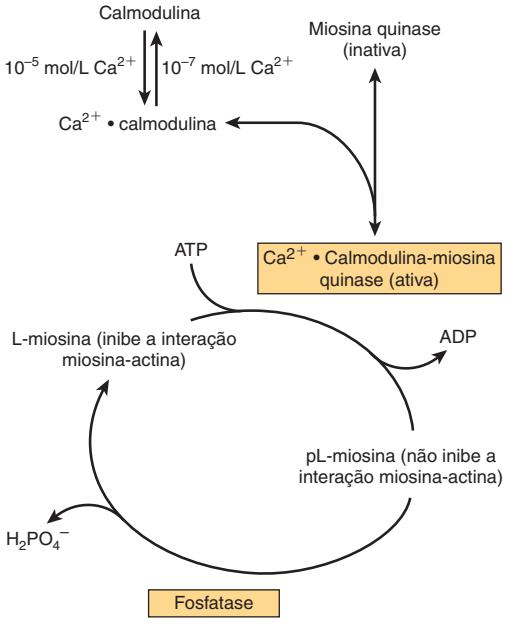


FIGURA 49-14 Regulação da contração do músculo liso pelo Ca^{2+}. A pL-miosina é a cadeia leve fosforilada da miosina, enquanto a L-miosina é a cadeia leve desfosforilada. (Adaptada, com autorização, de Adelstein RS, Eisenberg R: Regulation and kinetics of actin-myosin ATP interaction. Annu Rev Biochem 1980;49:921. Copyright © 1980 por Annual Reviews, www.annualreviews.org.)

da cadeia leve ativada pela calmodulina-4Ca^{2+} fosforila as cadeias leves, que então param de inibir a interação entre a miosina e a actina-F. Começa, então, o ciclo de contração.

No músculo liso, existe outra via independente de Ca^{2+} que dá início à contração. Essa via envolve a **Rho quinase**, que é ativada por uma variedade de estímulos (não mostrada na Figura 49-14). Essa enzima fosforila a fosfatase da cadeia leve de miosina, inibindo-a e, assim, aumentando a fosforilação da cadeia leve. A Rho-quinase também fosforila diretamente a cadeia leve de miosina. Essas duas ações aumentam a contração do músculo liso.

O músculo liso relaxa quando a concentração de Ca^{2+} cai abaixo de 10^{-7}

Ocorre relaxamento do músculo liso quando o Ca^{2+} sarcoplasmático cai abaixo de 10^{-7} mol/L. O **Ca^{2+}** dissocia-se da calmodulina, que, por sua vez, dissocia-se da quinase da cadeia leve de miosina, inativando-a. Nenhum outro fosfato liga-se à cadeia leve p, e a **proteína fosfatase da cadeia leve**, que é continuamente ativa e independente de cálcio, remove os fosfatos existentes das cadeias leves. A cadeia leve p da miosina desfosforilada inibe então a ligação das cabeças de miosina à actina-F e a atividade da ATPase. A cabeça da miosina separa-se da actina-F na presença de ATP, porém não pode ligar-se novamente, devido à presença de cadeia leve p desfosforilada; por isso, ocorre **relaxamento**.

A **Tabela 49-7** fornece um resumo e uma comparação da regulação das interações entre actina e miosina (ativação da miosina ATPase) nos músculos estriado e liso.

A quinase da cadeia leve da miosina não é diretamente afetada ou ativada pelo **AMPc**. Entretanto, a proteinoquinase ativada por AMPc pode fosforilar a quinase da cadeia leve de miosina (mas não as próprias cadeias leves). A quinase da cadeia leve de miosina fosforilada exibe uma afinidade significativamente menor pela calmodulina-Ca^{2+} e, portanto, é menos sensível à ativação. Assim, um **aumento do AMPc amortece a resposta de contração** do músculo liso em determinada elevação do Ca^{2+} sarcoplasmático. Esse mecanismo molecular pode explicar o efeito relaxante da estimulação β-adrenérgica do músculo liso.

Outra proteína que parece desempenhar um papel dependente de Ca^{2+} na regulação da contração do músculo liso é a **caldesmona** (87 kDa). Essa proteína é ubíqua no músculo liso e também é encontrada no tecido não muscular. Na presença de baixas concentrações de Ca^{2+}, a caldesmona liga-se à tropomiosina e à actina. Isso **impede a interação da actina com a miosina**,

TABELA 49-7 Interações actina-miosina nos músculos estriado e liso

	Músculo estriado	Músculo liso (e células não musculares)
Proteínas dos filamentos musculares	Actina Miosina Tropomiosina Troponina (TpI, TpT, TpC)	Actina Miosina[1] Tropomiosina
Interação espontânea da actina-F e da miosina isoladas (ativação espontânea da ATPase da miosina pela actina-F)	Sim	Não
Inibidor da interação entre a actina-F e a miosina (inibidor da ativação da ATPase dependente de actina-F)	Sistema da troponina (TpI)	Cadeia leve da miosina não fosforilada
Contração ativada por	Ca^{2+}	Ca^{2+}
Efeito direto do Ca^{2+}	4Ca^{2+} ligam-se à TpC	4Ca^{2+} ligam-se à calmodulina
Efeito do Ca^{2+} ligado à proteína	A TpC·4Ca^{2+} antagoniza a inibição da interação entre a actina-F e a miosina pela TpI (possibilita a ativação da ATPase pela actina-F)	A calmodulina·4Ca^{2+} ativa a quinase da cadeia leve de miosina, que fosforila a cadeia leve p da miosina. A cadeia leve p fosforilada não inibe mais a interação entre a actina-F e a miosina (possibilita a ativação da ATPase pela actina-F)

[1]As cadeias leves da miosina são diferentes nos músculos estriado e liso.

mantendo o músculo em um estado relaxado. Em concentrações mais altas de Ca^{2+}, a Ca^{2+}-calmodulina liga-se à caldesmona, **liberando-a da actina**. Esta última fica então livre para ligar-se à miosina, e pode ocorrer contração. A caldesmona também está sujeita à fosforilação-desfosforilação; quando fosforilada, não pode ligar-se à actina, liberando novamente esta última para interagir com a miosina. A caldesmona também pode participar na organização da estrutura do aparelho contrátil no músculo liso. Muitos de seus efeitos foram demonstrados *in vitro,* e a sua importância fisiológica ainda está em fase de investigação.

Conforme assinalado na Tabela 49-3, o ciclo lento das pontes cruzadas possibilita uma contração prolongada e lenta do músculo liso (p. ex., nas vísceras e nos vasos sanguíneos), com menor utilização de ATP em comparação com o músculo estriado. A capacidade do músculo liso de manter a força em velocidades reduzidas de contração é designada como **estado de tranca**; trata-se de uma importante característica do músculo liso, cuja base molecular precisa ainda se encontra em estudo.

O óxido nítrico (NO) relaxa o músculo liso dos vasos sanguíneos e também desempenha muitas outras funções biológicas importantes

A acetilcolina é um vasodilatador que atua causando relaxamento do músculo liso dos vasos sanguíneos. Entretanto, a acetilcolina não age diretamente sobre o músculo liso. Uma observação fundamental foi a de que, quando as **células endoteliais** são separadas das células musculares lisas subjacentes, a acetilcolina não exerce mais seu efeito vasodilatador. Esse achado indicou que os vasodilatadores, como a acetilcolina, interagem inicialmente com as células endoteliais dos pequenos vasos sanguíneos por meio de receptores. Os receptores estão acoplados ao ciclo de fosfoinositídeo, levando à liberação intracelular de Ca^{2+} pela ação do inositol trifosfato. Por sua vez, a elevação do Ca^{2+} determina a liberação do **fator de relaxamento derivado do endotélio** (**EDRF**), que se difunde no músculo liso adjacente. Nesse local, o fator reage com a fração heme de uma guanilil ciclase solúvel, resultando em ativação desta última, com consequente elevação dos níveis intracelulares de **GMPc** (**Figura 49-15**). Por sua vez, isso estimula as atividades de certas proteínas quinases dependentes de GMPc, que provavelmente fosforilam proteínas musculares específicas, causando relaxamento; todavia, os detalhes desse processo ainda estão sendo esclarecidos. O importante vasodilatador das artérias coronárias, a **nitroglicerina**, que é amplamente utilizado para aliviar a angina de peito, atua aumentando a liberação intracelular do EDRF e, portanto, de GMPc.

Repentinamente, foi constatado que o EDRF era o gás **NO**. O NO é formado pela ação da enzima NO sintase, que é citosólica. As formas endotelial e neuronal da NO sintase são ativadas pelo Ca^{2+} (**Tabela 49-8**). O substrato é a **arginina**, e os produtos são a citrulina e o NO:

$$\text{Arginina} \xrightarrow{\text{NO SINTASE}} \text{Citrulina} + \text{NO}$$

A **NO sintase** catalisa uma oxidação de cinco elétrons de um nitrogênio amidina da arginina. A L-hidroxiarginina é um intermediário que permanece firmemente ligado à enzima. A NO sintase é uma enzima muito complexa, que utiliza cinco cofatores redox: NADPH, FAD, FMN, heme e tetra-hidrobiopterina. O NO também pode ser formado a partir do **nitrito**, derivado do metabolismo de vasodilatadores, como o trinitrato de gliceril. O NO tem uma meia-vida muito curta (de aproximadamente três a quatro segundos) nos tecidos, em virtude de sua reação com o oxigênio e o superóxido. O produto da reação com o superóxido é o **peroxinitrito** ($ONOO^-$), que se decompõe para formar o radical $OH^{\cdot}$ altamente reativo. O NO é inibido pela hemoglobina e por outras hemeproteínas, que se ligam firmemente ao NO. Atualmente, dispõe-se de **inibidores químicos da NO sintase** que podem diminuir acentuadamente a formação de NO. A administração desses inibidores a animais e a seres humanos leva à vasoconstrição e a uma notável elevação da pressão arterial, indicando que o NO é de suma importância na manutenção da pressão arterial *in vivo.* Outro efeito cardiovascular importante é que, ao aumentar a síntese de GMPc, o NO atua como **inibidor da agregação plaquetária** (Capítulo 51).

Desde a descoberta do papel do NO com vasodilatador, surgiu um grande interesse experimental por essa substância. Verificou-se que o NO desempenha uma variedade de papéis fisiológicos, envolvendo praticamente todos os tecidos do corpo (**Tabela 49-9**). Foram identificadas três isoformas importantes da NO sintase; cada uma delas foi clonada e foi estabelecida a localização cromossômica de seus genes nos seres humanos. Foram realizados experimentos genéticos de *knockout* para cada uma

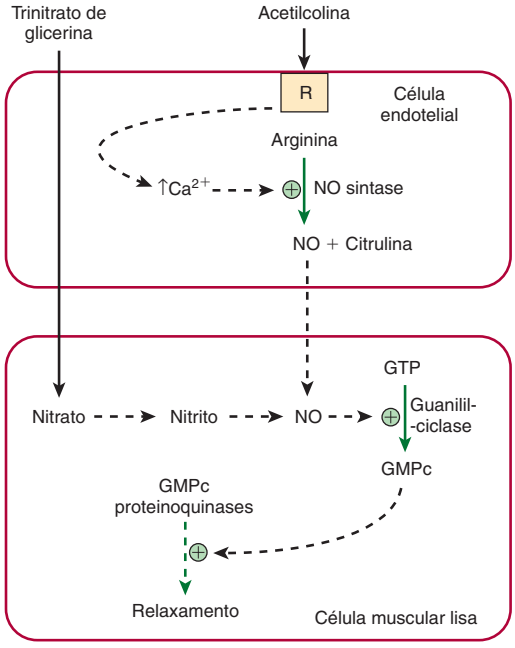


FIGURA 49-15 Diagrama mostrando a formação, em uma célula endotelial, do óxido nítrico (NO) a partir da arginina, em reação catalisada pela NO sintase. A interação de um agonista (p. ex., acetilcolina) com um receptor (R) provavelmente leva à liberação intracelular de Ca^{2+} por meio do inositol trifosfato gerado pela via do fosfoinositídeo, resultando em ativação da NO sintase. Subsequentemente, o NO difunde-se para dentro do músculo liso adjacente, onde leva à ativação da guanilil ciclase, formação de GMPc, estimulação das GMPc proteínas quinases e relaxamento subsequente. A figura mostra o vasodilatador nitroglicerina entrando na célula muscular lisa, onde seu metabolismo também leva à formação de NO.

TABELA 49-8 Resumo da nomenclatura das NO sintases e efeitos do *knockout* de seus genes em camundongos

Subtipo	Nome[1]	Comentários	Resultado do *knockout* dos genes em camundongos[2]
1	nNOS	A atividade depende dos níveis elevados de Ca^{2+}; inicialmente identificada em neurônios; ativada pela calmodulina	Estenose pilórica, resistente ao acidente vascular, comportamento sexual agressivo (em machos)
2	iNOS[3]	Independente dos níveis elevados de Ca^{2+}; proeminente nos macrófagos	Mais suscetíveis a certos tipos de infecção
3	eNOS	A atividade depende dos níveis elevados de Ca^{2+}; identificada inicialmente em células endoteliais	Elevação da pressão arterial média

Fonte: Adaptada de Snyder SH: NO. Nature 1995;377:196.
[1]e, endotelial; i, induzível; n, neuronal.
[2]Foram realizados *knockouts* de genes por recombinação de homólogos em camundongos. As enzimas são caracterizadas como neuronais, induzíveis (macrófagos) e endoteliais, com base nos locais onde foram identificadas pela primeira vez. Entretanto, todas as três enzimas já foram encontradas em outros locais, e a enzima neuronal também é induzível. Cada gene foi clonado, e a sua localização cromossômica nos seres humanos foi determinada.
[3]A iNOS é independente de Ca^{2+}, porém liga-se muito firmemente à calmodulina.

das três isoformas, ajudando a estabelecer algumas das funções postuladas do NO.

Para resumir, as pesquisas realizadas na última década mostraram que o NO desempenha um importante papel em numerosos processos fisiológicos e patológicos.

VÁRIOS MECANISMOS SÃO RESPONSÁVEIS PELA REPOSIÇÃO DAS RESERVAS DE ATP NO MÚSCULO

O **ATP** necessário como fonte de energia constante para o ciclo de contração-relaxamento do músculo pode ser gerado (1) pela glicólise, utilizando a glicose do sangue ou o glicogênio muscular, (2) pela fosforilação oxidativa, (3) a partir da creatina fosfato e (4) a partir de duas moléculas de ADP, em uma reação catalisada pela adenilato-quinase (**Figura 49-16**). A quantidade de ATP presente no músculo esquelético é apenas suficiente para fornecer a energia usada para a contração por alguns segundos, de modo que o ATP precisa ser constantemente renovado a partir de uma ou mais dessas fontes mencionadas, dependendo das condições metabólicas. Conforme discutido adiante, existem pelo menos **dois tipos distintos de fibras** no músculo esquelético, uma predominantemente ativa em condições **aeróbias**, e a outra ativa em condições anaeróbias; como previsto, essas fibras utilizam, em graus diferentes, cada uma das fontes de energia mencionadas.

TABELA 49-9 Algumas funções fisiológicas e importância patológica do óxido nítrico (NO)

- Vasodilatador, importante na regulação da pressão arterial.
- Envolvido na ereção do pênis; o citrato de sildenafila (Viagra) afeta esse processo ao inibir a GMPc fosfodiesterase.
- Neurotransmissor no cérebro e no sistema nervoso autônomo periférico.
- Papel na potencialização de longo prazo.
- Papel na neurotoxicidade.
- Baixos níveis de NO envolvidos na causa do piloroespasmo na estenose pilórica hipertrófica infantil.
- Pode desempenhar um papel no relaxamento do músculo esquelético.
- Pode constituir parte de um sistema imune primitivo.
- Inibe a adesão, a ativação e a agregação das plaquetas.

O músculo esquelético contém grandes suprimentos de glicogênio

O sarcoplasma do músculo esquelético contém grandes reservas de **glicogênio**, que estão localizadas em grânulos próximos às bandas I. A liberação de glicose a partir do glicogênio depende de uma **glicogênio fosforilase** muscular específica (Capítulo 19), que pode ser ativada por Ca^{2+}, pela epinefrina e pelo AMP. Para gerar a glicose-6-fosfato destinada à glicólise no músculo esquelético, a glicogênio fosforilase b precisa ser ativada à fosforilase a por meio de fosforilação catalisada pela fosforilase b quinase (Capítulo 19). O Ca^{2+} promove a ativação da fosforilase b quinase, também por fosforilação. Por conseguinte, o Ca^{2+} inicia a contração muscular e também ativa uma via que fornece a energia necessária. O hormônio **epinefrina** também ativa a glicogenólise no músculo. O **AMP**, que é produzido pela degradação do ADP durante o exercício muscular, também pode ativar a fosforilase b sem causar fosforilação. A glicogênio fosforilase b muscular encontra-se inativa na **doença de McArdle**, uma das doenças de armazenamento do glicogênio (Capítulo 19).

Em condições aeróbias, o músculo gera ATP principalmente por fosforilação oxidativa

A síntese de ATP por **fosforilação oxidativa** requer um suprimento de oxigênio. Os músculos que apresentam alta demanda de oxigênio, em consequência de contração sustentada (p. ex., para manter a postura), o armazenam fixado à fração heme da **mioglobina**. Devido à presença da fração heme, os músculos que contêm mioglobina são vermelhos, ao passo que os músculos com pouca ou nenhuma mioglobina são brancos. A **glicose**, derivada da glicose do sangue ou do glicogênio endógeno, e os **ácidos graxos**, derivados dos triacilgliceróis do tecido adiposo, constituem os principais substratos utilizados no metabolismo aeróbio no músculo.

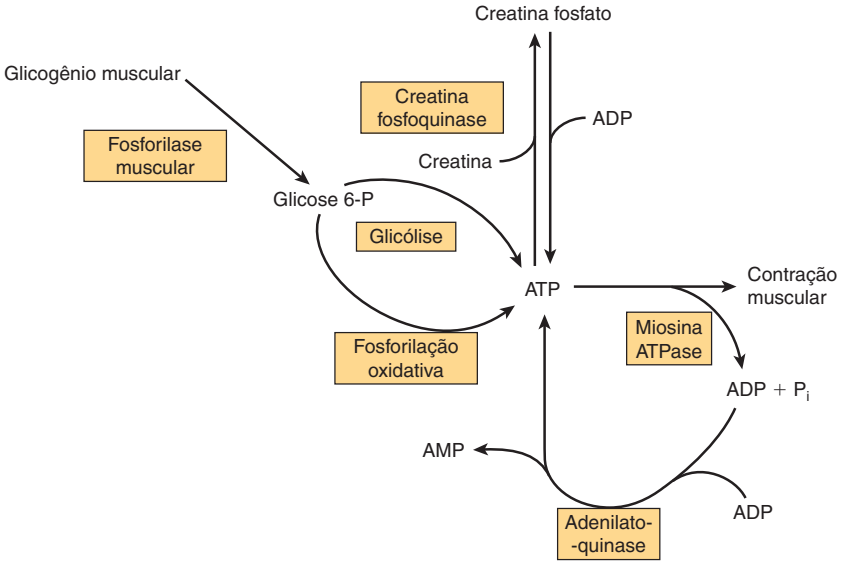


FIGURA 49-16 As múltiplas fontes de ATP no músculo.

A creatina fosfato constitui uma importante reserva de energia no músculo

A **creatina fosfato** impede a rápida depleção do ATP, visto que disponibiliza prontamente um fosfato de alta energia que pode ser usado para regenerar o ATP a partir do ADP. A creatina fosfato é formada a partir de ATP e creatina (Figura 49-16) em momentos nos quais o músculo está relaxado, e as demandas de ATP não são consideráveis. A enzima que catalisa a fosforilação da creatina é a **creatina-quinase** (CK), uma enzima muscular específica com utilidade clínica na detecção de doenças musculares agudas ou crônicas.

O MÚSCULO ESQUELÉTICO CONTÉM FIBRAS DE CONTRAÇÃO LENTA (VERMELHAS) E DE CONTRAÇÃO RÁPIDA (BRANCAS)

Foram detectados diferentes tipos de fibras no músculo esquelético. Uma classificação as subdivide em tipo I (de contração lenta), tipo IIA (de contração rápida – oxidativas) e tipo IIB (de contração rápida – glicolíticas). Para simplificar, serão considerados apenas dois tipos: o tipo I (de contração lenta, oxidativas) e o tipo II (de contração rápida, glicolíticas) (**Tabela 49-10**). As fibras do **tipo I** são vermelhas, pois contêm mioglobina e mitocôndrias; seu metabolismo é aeróbio, e elas mantêm contrações relativamente sustentadas. As fibras do **tipo II**, que carecem de mioglobina e que contêm poucas mitocôndrias, são brancas; obtêm a sua energia da glicólise anaeróbia e exibem contrações de duração relativamente curta. A **proporção** desses dois tipos de fibras varia entre os diferentes músculos do corpo, dependendo de sua função (p. ex., se determinado músculo está ou não envolvido em contrações sustentadas, como os que mantêm a postura). A proporção também varia com o **treinamento**; por exemplo, a quantidade de fibras do tipo I em certos músculos das pernas aumenta em atletas que treinam para maratonas, enquanto a quantidade de fibras do tipo II aumenta nos velocistas.

Um velocista utiliza a creatina fosfato e a glicólise anaeróbia para produzir ATP, enquanto um corredor de maratona utiliza a fosforilação oxidativa

Tendo em vista os dois tipos de fibras no músculo esquelético e as várias fontes de energia descritas anteriormente, é interessante comparar a sua participação em uma corrida de velocidade (p. ex., 100 metros) e em uma maratona (42,2 km; pouco mais de 26 milhas) (**Tabela 49-11**).

As principais fontes de energia na **corrida de 100 m** são constituídas pela **creatina fosfato** (primeiros quatro a cinco segundos) e, em seguida, pela **glicólise anaeróbia**, utilizando o glicogênio muscular como fonte de glicose. Os dois principais locais de controle metabólico são a **glicogênio fosforilase** e a **PFK-1**. A primeira é ativada pelo Ca^{2+} (liberado do RS durante a contração), pela epinefrina e pelo AMP. A PFK-1 é ativada pelo AMP, P_i e NH_3. Atestando a eficiência desses processos, o fluxo pela glicólise pode aumentar em até 1.000 vezes durante uma corrida de velocidade.

TABELA 49-10 Características das fibras tipo I e tipo II no músculo esquelético

	Tipo I, de contração lenta	Tipo II, de contração rápida
Miosina ATPase	Baixa	Alta
Utilização de energia	Baixa	Alta
Mitocôndrias	Numerosas	Poucas
Cor	Vermelha	Branca
Mioglobina	Sim	Não
Velocidade de contração	Lenta	Rápida
Duração	Prolongada	Curta

TABELA 49-11 Tipos de fibras musculares e principais fontes de energia usadas por um velocista e por um maratonista

Velocista (100 m)	Maratonista
As fibras do tipo II (glicolíticas) são predominantemente usadas	As fibras do tipo I (oxidativas) são predominantemente usadas
A creatina fosfato constitui a principal fonte de energia durante os primeiros 4 a 5 s	O ATP constitui a principal fonte de energia durante todo o trajeto
A glicose derivada do glicogênio muscular e metabolizada pela glicólise anaeróbia constitui a principal fonte de energia	A glicose do sangue e os ácidos graxos livres constituem as principais fontes de energia
Ocorre rápida depleção do glicogênio muscular	Ocorre depleção lenta do glicogênio muscular

Por outro lado, na **maratona**, o **metabolismo aeróbio** constitui a principal fonte de ATP. As principais fontes de energia são a **glicose do sangue** e os **ácidos graxos livres**, derivados, em grande parte, da degradação dos triacilgliceróis no tecido adiposo, estimulada pela epinefrina. O glicogênio hepático é degradado para manter o nível de glicemia. O glicogênio muscular também representa uma fonte de energia, porém é degradado de modo muito mais gradual do que em uma corrida de velocidade. Foi calculado que as quantidades de glicose no sangue, de glicogênio no fígado, de glicogênio no músculo e de triacilglicerol no tecido adiposo são suficientes para fornecer aos músculos a energia para uma maratona durante quatro, 18, 70 e aproximadamente 4.000 min, respectivamente. Entretanto, a velocidade de oxidação dos ácidos graxos pelo músculo é mais lenta que a da glicose, de modo que a oxidação da glicose e dos ácidos graxos constitui uma importante fonte de energia na maratona.

Diversos procedimentos têm sido usados por atletas para combater a fadiga muscular e a falta de força. Esses procedimentos incluem a **ingestão aumentada de carboidratos**, **ingestão aumentada de bicarbonato de sódio**, o ***doping* sanguíneo** (administração de eritrócitos) e a ingestão de **creatina** e de **androstenediona**. Os princípios racionais e as eficácias desses procedimentos não serão discutidos aqui.

O MÚSCULO ESQUELÉTICO CONSTITUI A PRINCIPAL RESERVA DE PROTEÍNA NO CORPO

Nos seres humanos, a **proteína do músculo esquelético** constitui a principal fonte não gordurosa de energia armazenada. Isso explica as perdas muito grandes de massa muscular, particularmente em adultos, em decorrência de subnutrição calórica prolongada.

O estudo da **degradação das proteínas teciduais** *in vivo* é complicado, visto que os aminoácidos liberados durante a degradação intracelular das proteínas podem ser extensamente reutilizados para a síntese de proteína no interior da célula, ou podem ser transportados para outros órgãos, onde entram em vias anabólicas. Todavia, a actina e a miosina são metiladas por uma reação pós-tradução, formando **3-metil-histidina**. Durante a degradação intracelular e da miosina, ocorre liberação de 3-metil-histidina, que é excretada na urina. O débito urinário do aminoácido metilado fornece um índice confiável da velocidade de degradação das proteínas miofibrilares na musculatura dos seres humanos.

A **Tabela 49-12** fornece um resumo de vários aspectos do metabolismo muscular, a maior parte dos quais é tratada em outros capítulos desta obra.

TABELA 49-12 Resumo das principais características bioquímicas relativas ao metabolismo do músculo esquelético[1]

- O músculo esquelético funciona em condições tanto aeróbias (em repouso) quanto anaeróbias (p. ex., corrida de velocidade), de modo que tanto a glicólise aeróbia quanto a glicólise anaeróbia operam dependendo das condições.
- O músculo esquelético contém mioglobina como reservatório de oxigênio.
- O músculo esquelético contém diferentes tipos de fibras principalmente adaptadas para condições anaeróbias (fibras de contração rápida) ou aeróbias (fibras de contração lenta).
- A actina, a miosina, a tropomiosina, o complexo de troponina (TpT, TpI e TpC), o ATP e o Ca^{2+} são constituintes-chave para a contração.
- A Ca^{2+} ATPase, o canal de liberação de Ca^{2+} e a calsequestrina são proteínas envolvidas em vários aspectos do metabolismo do Ca^{2+} no músculo.
- A insulina atua sobre o músculo esquelético, aumentando a captação de glicose.
- No estado alimentado, a maior parte da glicose é utilizada na síntese de glicogênio, que atua como reserva de glicose para uso durante o exercício físico; alguns atletas de longa distância utilizam uma "pré-carga" com glicose para aumentar as reservas de glicogênio.
- A epinefrina estimula a glicogenólise no músculo esquelético, enquanto o glucagon não o faz, devido à ausência de seus receptores.
- O músculo esquelético não pode contribuir diretamente para a glicose do sangue, visto que ele não contém glicose-6-fosfatase.
- O lactato produzido no músculo esquelético pelo metabolismo anaeróbio passa para o fígado, que o utiliza na síntese de glicose, que pode então retornar ao músculo (ciclo de Cori).
- O músculo esquelético contém fosfocreatina, que atua como reserva de energia para demandas de curto prazo (segundos).
- Os ácidos graxos livres no plasma constituem uma importante fonte de energia, particularmente em condições de maratona e no jejum prolongado.
- O músculo esquelético pode utilizar corpos cetônicos durante a inanição.
- O músculo esquelético constitui o principal local de metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada, que são usados como fonte de energia.
- A proteólise do músculo durante a inanição supre aminoácidos para a gliconeogênese.
- Os principais aminoácidos provenientes do músculo são a alanina (destinada principalmente à gliconeogênese no fígado e que faz parte do ciclo de glicose-alanina) e a glutamina (destinada principalmente ao intestino e aos rins).

[1]Esta tabela reúne material de vários capítulos deste livro.

TABELA 49-13 Algumas propriedades dos microfilamentos e dos microtúbulos

	Microfilamentos	Microtúbulos
Proteína(s)	Actina	α-e β-Tubulinas
Diâmetro	8 a 9 nm	25 nm
Funções	Estrutural, motilidade	Estrutural, motilidade, polaridade

Nota: Algumas propriedades dos filamentos intermediários são descritas na Tabela 49-14.

TABELA 49-14 Classes de filamentos intermediários das células eucarióticas e suas distribuições

Proteínas	Massa molecular (kDa)	Distribuições
Laminas		
A, B e C	65 a 75	Lamina nuclear
Queratinas		
Tipo I (ácidas)	40 a 60	Células epiteliais, pelos, unhas
Tipo II (básicas)	50 a 70	Iguais às do tipo I (ácidas)
Semelhantes à vimentina		
Vimentina	54	Várias células mesenquimais
Desmina	53	Músculo
Proteína ácida fibrilar glial	50	Células gliais
Periferina	66	Neurônios
Neurofilamentos		
Baixos (L), médios (M) e altos (H)[1]	60 a 130	Neurônios

Nota: Os filamentos intermediários apresentam um diâmetro aproximado de 10 nm e desempenham várias funções. Por exemplo, as queratinas estão amplamente distribuídas nas células epiteliais e aderem aos desmossomos e aos hemidesmossomos por proteínas adaptadoras. As laminas fornecem um suporte para a membrana nuclear.
[1]Os tipos referem-se à sua massa molecular.

O CITOESQUELETO DESEMPENHA MÚLTIPLAS FUNÇÕES CELULARES

As células não musculares realizam trabalho mecânico, incluindo autopropulsão, morfogênese, clivagem, endocitose, exocitose, transporte intracelular e mudança do formato da célula. Essas funções celulares são executadas por uma extensa rede intracelular de estruturas filamentosas, constituindo o **citoesqueleto**. O citoplasma celular não é um saco contendo líquido, como se acreditava. Essencialmente, todas as células eucarióticas contêm três tipos de estruturas filamentosas: os **filamentos de actina** (também conhecidos como microfilamentos), os **microtúbulos** e os **filamentos intermediários**. Cada tipo de filamento pode ser distinguido por métodos bioquímicos e por microscopia eletrônica.

As **Tabelas 49-13** e **49-14** fornecem um resumo de algumas propriedades dessas três estruturas.

As células não musculares contêm actina que forma microfilamentos

A **actina-G** é encontrada na maioria das células do corpo, se não em todas elas. Na presença de concentrações apropriadas de cloreto de magnésio e de potássio, a actina-G sofre polimerização espontânea, formando filamentos de **actina-F** em dupla-hélice, como aqueles observados no músculo. Existem pelo menos dois tipos de actina nas células não musculares: a β-actina e a γ-actina. Ambos os tipos podem coexistir na mesma célula e, provavelmente, podem até mesmo copolimerizar no mesmo filamento. No citoplasma, a **actina-F** forma **microfilamentos** de 7 a 9 nm, que frequentemente ocorrem na forma de feixes de uma rede de aparência emaranhada. Esses feixes são proeminentes logo abaixo da membrana plasmática de muitas células e são designados como **fibras de estresse**. As fibras de estresse desaparecem à medida que a motilidade das células aumenta ou com a transformação maligna das células por substâncias químicas ou vírus oncogênicos.

Embora não estejam organizados como nos músculos, os filamentos de actina nas células não musculares interagem com a **miosina**, produzindo movimentos celulares.

Os microtúbulos contêm α-e β-tubulinas

Os **microtúbulos**, que constituem um componente integral do citoesqueleto celular, consistem em tubos citoplasmáticos de 25 nm de diâmetro e comprimento frequentemente muito grande (ver **Figura 49-17**). Os microtúbulos são necessários para a formação e a função do **fuso mitótico** e, portanto, estão presentes em todas as células eucarióticas. Estão também envolvidos no movimento intracelular das vesículas endocíticas e exocíticas e formam os principais componentes estruturais dos **cílios** e dos **flagelos**. Os microtúbulos constituem um importante componente dos **axônios** e dos **dendritos**, nos quais mantêm a estrutura e participam do fluxo axoplasmático de material ao longo desses processos neuronais.

Os **microtúbulos** são cilindros de 13 protofilamentos de orientação longitudinal, consistindo, cada um deles, em dímeros de **α-tubulina** e **β-tubulina**, proteínas estreitamente relacionadas de aproximadamente 50 kDa de massa molecular. Os dímeros de tubulina organizam-se em protofilamentos e, subsequentemente, em lâminas e, a seguir, em cilindros. Um centro de organização dos microtúbulos, localizado ao redor de um par de centríolos, atua como núcleo para o crescimento de novos microtúbulos. Uma terceira espécie de tubulina, a **γ-tubulina**, parece desempenhar um importante papel nessa montagem, na qual o **GTP** também é necessário. Diversas proteínas estão associadas aos microtúbulos (**proteínas associadas aos microtúbulos** [**MAP**], uma das quais é **tau**) e desempenham importantes papéis na montagem e na estabilização dos microtúbulos. Os microtúbulos encontram-se em estado de instabilidade dinâmica, com montagem e desmontagem constantes. Exibem **polaridade** (extremidades mais e menos), o que é relevante para o seu crescimento a partir dos centríolos e para a sua capacidade de orientar o movimento intracelular. Por exemplo, no transporte axônico, a proteína **cinesina,** que apresenta atividade de ATPase semelhante à miosina, utiliza a hidrólise do ATP para deslocar as vesículas ao longo do axônio em direção à extremidade positiva da formação microtubular. O fluxo de materiais em sentido oposto, em direção à extremidade negativa, é impulsionado pela **dineína citosólica**, outra proteína com atividade de ATPase. De modo semelhante,

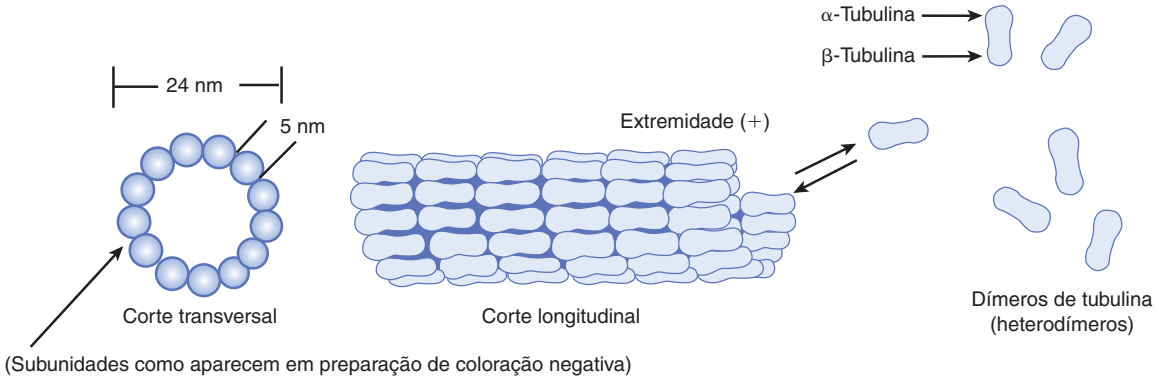


FIGURA 49-17 Representação esquemática dos microtúbulos. A parte esquerda superior mostra um desenho de microtúbulos como aparecem ao microscópio eletrônico após fixação com ácido tânico em glutaraldeído. As subunidades de tubulina não coradas são delineadas pelo ácido tânico denso. Os cortes transversais dos túbulos revelam um anel de 13 subunidades de dímeros dispostos em uma espiral. As mudanças no comprimento dos microtúbulos devem-se ao acréscimo ou à perda de subunidades individuais de tubulina. São encontrados arranjos característicos de microtúbulos (não mostrados aqui) nos centríolos, corpúsculos basais, cílios e flagelos. (Reproduzida, com autorização, de Junqueirai LC, Carneiro J, Kelley RO: *Basic Histology,* 7th ed. Appleton & Lange, 1992.)

as **dineínas axonemais** dão impulso aos movimentos ciliares e flagelares. Outra proteína, a **dinamina,** utiliza o GTP e está envolvida na endocitose. As cinesinas, as dineínas, a dinamina e as miosinas são designadas como **motores moleculares.**

A ausência de dineína nos cílios e nos flagelos resulta em sua imobilidade, levando à esterilidade masculina, *situs inversus* e infecção respiratória crônica, condição conhecida como **síndrome de Kartagener** (OMIM 244400). Em indivíduos com essa síndrome, foram detectadas mutações nos genes que afetam a síntese de dineína.

Determinados **fármacos** ligam-se aos microtúbulos e, assim, interferem na sua montagem ou desmontagem. Esses fármacos incluem a **colchicina** (usada no tratamento da artrite gotosa aguda), a **vimblastina** (alcaloide da vinca empregado no tratamento de certos tipos de câncer), o **paclitaxel** (Taxol) (efetivo contra o câncer de ovário) e a **griseofulvina** (um agente antifúngico).

Os filamentos intermediários diferem dos microfilamentos e dos microtúbulos

Existe um sistema fibroso intracelular de filamentos, com periodicidade axial de 21 nm e diâmetro de 8 a 10 nm, que é intermediário entre o dos microfilamentos (6 nm) e o dos microtúbulos (23 nm). São encontradas pelo menos quatro classes de **filamentos intermediários**, conforme indicado na Tabela 49-14.

Todos os filamentos intermediários são moléculas fibrosas alongadas, com um domínio em bastão central, uma cabeça aminoterminal e uma cauda carboxiterminal. Formam uma estrutura semelhante a uma corda, e os filamentos maduros são compostos de tetrâmeros reunidos em uma disposição helicoidal. Constituem componentes estruturais importantes das células, e a maioria consiste em componentes **relativamente estáveis** do citoesqueleto, que não sofrem rápida montagem e desmontagem e que não desaparecem durante mitose, como ocorre com a actina e com muitos filamentos microtubulares.

Uma significativa exceção é fornecida pelas **laminas** que, após a fosforilação, sofrem desmontagem na mitose e reaparecem quando ela termina. As **laminas** formam uma rede em aposição à membrana nuclear interna.

Mutações no gene que codifica a **lamina A** e lamina C causam a síndrome de progéria de Hutchinson-Gilford (**progéria**) [OMIM 176670], caracterizada pela ocorrência de **envelhecimento acelerado** e outras características. Uma forma farnesilada (ver Figura 26-2 para a estrutura do farnesil) de pré-lamina A acumula-se nessa síndrome, visto que o local de ação proteolítica normal para a clivagem da porção farnesilada da lamina A está alterado pela mutação. A lamina A constitui um importante componente do arcabouço estrutural que mantém a integridade do núcleo de uma célula. Parece que o acúmulo da pré-lamina A farnesilada torna os núcleos instáveis, alterando a sua forma, e isso predispõe, de algum modo, ao desenvolvimento de sinais de envelhecimento prematuro. Experimentos em camundongos indicaram que a administração de um inibidor da farnesiltransferase pode melhorar o desenvolvimento de núcleos deformados. As crianças acometidas frequentemente morrem na adolescência de aterosclerose. A **Figura 49-18** fornece um esquema resumido da causalidade da progéria.

As **queratinas** formam uma grande família, na qual se distinguem cerca de 30 membros. Conforme indicado na Tabela 49-14, são encontrados dois tipos principais de queratina; todas as queratinas individuais são **heterodímeros** constituídos de um membro de cada classe.

As **vimentinas** estão amplamente distribuídas nas células mesodérmicas, e a desmina, a proteína ácida fibrilar glial e a peri-

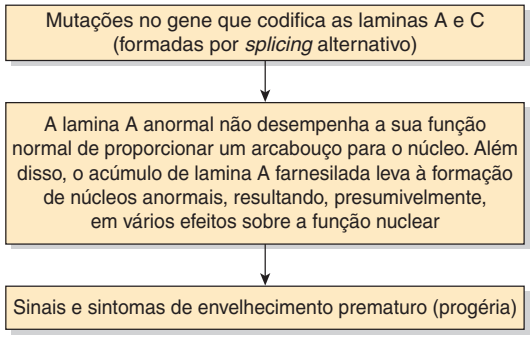


FIGURA 49-18 Esquema da causalidade da progéria (síndrome de Hutchinson-Gilford, OMIM 176670).

ferina estão relacionadas com as vimentinas. Todos os membros da família semelhante à vimentina podem sofrer copolimerização uns com os outros.

Os filamentos intermediários são muitos proeminentes nas células nervosas; os neurofilamentos são classificados, com base em suas massas moleculares, em baixos, médios e altos. A **distribuição dos filamentos intermediários** nas células normais e anormais (p. ex., no câncer) pode ser estudada pelo uso de técnicas imunofluorescentes, usando anticorpos com especificidades apropriadas. Esses anticorpos dirigidos contra filamentos intermediários específicos também podem ser utilizados para ajudar o patologista a decidir a origem de certos tumores malignos desdiferenciados. Esses tumores ainda podem conservar o tipo de filamento intermediário encontrado em suas células de origem.

Foram descritas várias **doenças cutâneas**, caracterizadas principalmente pela formação de bolhas, devido a mutações nos genes que codificam **várias queratinas**. Dois desses distúrbios são a epidermólise bolhosa simples (OMIM 131800) e a ceratodermia palmoplantar epidermolítica (OMIM 144200). As **bolhas** que ocorrem nesses distúrbios provavelmente refletem uma menor capacidade de várias camadas da pele de resistir aos estresses mecânicos, devido a anormalidades na estrutura das queratinas.

RESUMO

- As miofibrilas do músculo esquelético contêm filamentos grossos e finos. Os filamentos grossos contêm miosina. Os filamentos finos apresentam actina, tropomiosina e o complexo de troponina (troponinas T, I e C).
- O modelo de deslizamento dos filamentos com pontes cruzadas constitui a base sobre a qual se fundamenta o pensamento atual acerca da contração muscular. A base para esse modelo é a de que os filamentos interdigitados deslizam uns ao longo dos outros durante a contração, enquanto as pontes cruzadas entre a miosina e a actina geram e sustentam a tensão.
- A hidrólise do ATP é utilizada para acionar o movimento dos filamentos. O ATP liga-se às cabeças da miosina e é hidrolisado a ADP e P_i pela atividade de ATPase do complexo de actomiosina.
- O Ca^{2+} desempenha um papel essencial na iniciação da contração muscular pela sua ligação à troponina C. No músculo esquelético, o RS regula a distribuição do Ca^{2+} para os sarcômeros, enquanto o influxo de Ca^{2+} pelos canais de Ca^{2+} do sarcolema é de suma importância no músculo cardíaco e no músculo liso.
- Muitos casos de hipertermia maligna nos seres humanos devem-se a mutações no gene que codifica o canal de liberação de Ca^{2+}.
- Existem várias diferenças entre o músculo esquelético e o músculo cardíaco; em particular, este último contém uma variedade de receptores em sua superfície.
- Alguns casos de miocardiopatia hipertrófica familiar devem-se a mutações de sentido incorreto no gene que codifica a cadeia pesada da β-miosina. Foram também detectadas mutações nos genes que codificam várias outras proteínas.
- Diferentemente dos músculos esquelético e cardíaco, o músculo liso não contém o sistema de troponina; em vez disso, a fosforilação das cadeias leves de miosina dá início à contração.
- O NO é um regulador do músculo liso vascular; o bloqueio de sua formação a partir da arginina provoca elevação aguda da pressão arterial, indicando que a regulação da pressão arterial constitui uma de suas numerosas funções.
- A distrofia muscular do tipo Duchenne é causada por mutações no gene que codifica a proteína distrofina, localizado no cromossomo X.
- Nos seres humanos, são encontrados dois tipos principais de fibras musculares: as fibras brancas (anaeróbias) e as vermelhas (aeróbias). As primeiras são particularmente usadas em corridas de velocidade, enquanto as segundas são utilizadas no exercício aeróbico prolongado. Durante uma corrida de velocidade, o músculo utiliza creatina fosfato e glicólise como fontes de energia; nas maratonas, a oxidação dos ácidos graxos assume maior importância durante as últimas fases.
- As células não musculares executam vários tipos de trabalho mecânico realizados pelas estruturas que constituem o citoesqueleto. Essas estruturas incluem os filamentos de actina (microfilamentos), os microtúbulos (compostos principalmente de α-tubulina e de β-tubulina) e os filamentos intermediários. Estes últimos incluem as laminas, as queratinas, as proteínas semelhantes à vimentina e os neurofilamentos. Mutações no gene que codifica a lamina A causam progéria, condição caracterizada pela ocorrência de envelhecimento prematuro. Diversas doenças cutâneas são causadas por mutações em genes que codificam determinadas queratinas.

REFERÊNCIAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al: *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed. Garland Science, 2008. (Contains excellent coverage of muscle and the cytoskeleton).

Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL: *Ganong's Review of Medical Physiology*, 23rd ed. McGraw-Hill Lange, 2010. (Contains excellent coverage of skeletal, cardiac and smooth muscle structure and function).

Brosnan JT, Brosnan ME: Creatine: endogenous metabolite, dietary and therapeutic supplement. Annu Rev Nutr 2007;27:241.

Cooper GM, Hausman RE: *The Cell: A Molecular Approach*, 5th ed. Sinauer Associates Inc., 2009. (Contains excellent coverage of muscle and the cytoskeleton).

Lodish H, Berk A, Kaiser CA, et al: *Molecular Cell Biology,* 6th ed. WH Freeman & Co, 2008. (Contains excellent coverage of muscle and the cytoskeleton).

Murad F: Nitric oxide and cyclic GMP in cell signalling and drug development. N Engl J Med 2006;355:2003.

Murphy RT, Starling RC: Genetics and cardiomyopathy: where are we now? Cleve Clin J Med 2005;72:465.

Neubauer S: The failing heart—an engine out of fuel. N Engl J Med 2007;356:1140.

Pollard TD, Earnshaw WC: *Cell Biology,* 2nd ed. Saunders, 2008. (Contains excellent coverage of muscle and the cytoskeleton).

Sanders KM: Regulation of smooth muscle excitation and contraction. Neurogastroenterol Motil 2008;20 Suppl 1:39.

Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 8th ed. McGraw-Hill, 2001. (This comprehensive four-volume text and its updated online edition [see Chapter 1] contain chapters on malignant hyperthermia, channelopathies, hypertrophic cardiomyopathy, the muscular dystrophies, and disorders of intermediate filaments.)

Sweeney HL, Houdusse A: Structural and functional insights into the myosin motor mechanism. Annu Rev Biophys 2010;39:539.

Taimen P, Pfleghaar K, Shimi T, et al: A progeria mutation reveals functions for lamin A in nuclear assembly, architecture, and chromosome organization. Proc Natl Acad Sci USA 2009;106(49):20788.

CAPÍTULO

50

Proteínas Plasmáticas e Imunoglobulinas

Robert K. Murray, M.D., Ph.D., Molly Jacob, M.B. B.S., M.D., Ph.D., e Joe Varghese, M.B. B.S., M.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Citar as principais funções do sangue.
- Explicar as funções das principais proteínas plasmáticas, incluindo albumina, haptoglobina, transferrina, ceruloplasmina, α_1-antitripsina e α_2-macroglobulina.
- Descrever como a homeostasia do ferro é mantida e como é afetada em determinados distúrbios.
- Detalhar as estruturas gerais e as funções das cinco classes de imunoglobulinas e o uso de anticorpos monoclonais.
- Reconhecer que o sistema complemento está envolvido em vários processos biológicos importantes.
- Indicar as causas da doença de Wilson, da doença de Menkes, das doenças pulmonares e hepáticas associadas à deficiência de α_1-antitripsina, da amiloidose, do mieloma múltiplo e da agamaglobulinemia.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

O papel fundamental do sangue na manutenção da **homeostasia** (ver Capítulo 51) e a facilidade com que se obtêm amostras de sangue explicam por que o estudo de seus constituintes teve importância central no desenvolvimento da bioquímica e da bioquímica clínica. Este capítulo descreve as propriedades básicas de algumas **proteínas plasmáticas**, incluindo as **imunoglobulinas** (anticorpos). Ocorrem alterações quantitativas de várias proteínas plasmáticas e imunoglobulinas em muitas doenças, e essas alterações podem ser monitoradas por eletroforese ou por outros procedimentos apropriados. Conforme descrito em um dos capítulos anteriores, as alterações nas atividades de determinadas **enzimas** encontradas no plasma têm aplicação diagnóstica em diversas condições patológicas. As proteínas plasmáticas envolvidas na coagulação sanguínea são discutidas no Capítulo 51.

O SANGUE DESEMPENHA NUMEROSAS FUNÇÕES

As funções do sangue – exceto as funções celulares específicas, como transporte de oxigênio e defesa imunológica celular – são desempenhadas pelo plasma e por seus constituintes (**Tabela 50-1**).

O **plasma** consiste em água, eletrólitos, metabólitos, nutrientes, proteínas e hormônios. A composição eletrolítica do plasma é praticamente a mesma que a de todos os líquidos extracelulares. As dosagens laboratoriais dos níveis de Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cl^-, HCO_3^-, $PaCO_2$ e do pH sanguíneo são importantes no tratamento de muitos pacientes.

O PLASMA CONTÉM UMA MISTURA COMPLEXA DE PROTEÍNAS

A concentração de proteína total no plasma humano é de aproximadamente 7,0 a 7,5 g/dL, e essas proteínas constituem o principal componente sólido do plasma. Na verdade, as proteínas do plasma consistem em uma mistura complexa, que inclui não apenas as proteínas simples, mas também proteínas conjugadas, como as **glicoproteínas** e vários tipos de **lipoproteínas**. A aplicação de técnicas da proteômica possibilita o isolamento e a caracterização de proteínas plasmáticas até então desconhecidas, algumas presentes em quantidades muito pequenas (p. ex., detectadas no líquido de hemodiálise e no plasma de pacientes com câncer), ampliando, assim, o **proteoma plasmático**. Existem milhares de **anticorpos** no plasma humano, embora a quantidade de qualquer anticorpo específico geralmente seja muito pequena

TABELA 50-1 Principais funções do sangue

1.	**Respiração** – transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos e de CO_2 dos tecidos para os pulmões
2.	**Nutrição** – transporte de nutrientes absorvidos
3.	**Excreção** – transporte de produtos de degradação metabólicos para os rins, os pulmões, a pele e o intestino para eliminação
4.	Manutenção do **equilíbrio ácido-básico** normal do organismo
5.	Regulação do **equilíbrio hídrico** por meio dos efeitos do sangue sobre a troca de água entre o líquido circulante e os líquidos teciduais
6.	Regulação da **temperatura corporal** pela distribuição do calor corporal
7.	**Defesa** contra infecção pelos leucócitos e anticorpos circulantes
8.	Transporte de **hormônios** e regulação do metabolismo
9.	Transporte de **metabólitos**
10.	Coagulação

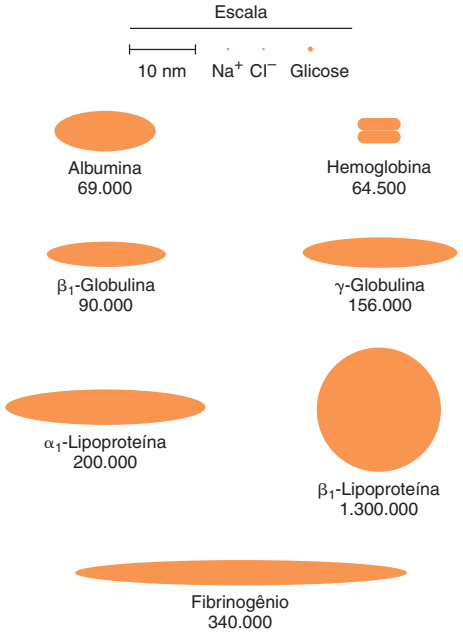


FIGURA 50-1 Dimensões relativas e massas moleculares aproximadas das moléculas de proteína no sangue (Oncley).

em circunstâncias normais. A **Figura 50-1** mostra as dimensões relativas e as massas moleculares de algumas das proteínas plasmáticas mais importantes.

A **separação** das proteínas individuais de uma mistura complexa é frequentemente obtida pelo uso de solventes ou eletrólitos (ou ambos) para remover as diferentes frações proteicas, de acordo com suas características de solubilidade. Isso constitui a base dos denominados métodos de precipitação, que têm algumas aplicações na determinação das frações proteicas no laboratório clínico. Por conseguinte, as proteínas do plasma podem ser separadas em três grupos principais – **fibrinogênio**, **albumina** e **globulinas** – pelo uso de várias concentrações de sulfato de sódio ou de amônio.

O método mais comum de análise das proteínas plasmáticas é a **eletroforese**. Existem muitos tipos de eletroforese, e cada uma delas utiliza um meio de suporte diferente. Nos laboratórios clínicos, o **acetato de celulose** é amplamente utilizado como meio de suporte. Seu uso possibilita, após a coloração, a resolução das proteínas plasmáticas em cinco bandas, designadas como frações de albumina, α_1, α_2, β e γ, respectivamente (**Figura 50-2**). A fita corada de acetato de celulose (ou outro meio de suporte) é denominada eletroforetograma. As quantidades dessas cinco bandas podem ser determinadas convenientemente com o uso de aparelhos de varredura densitomé-

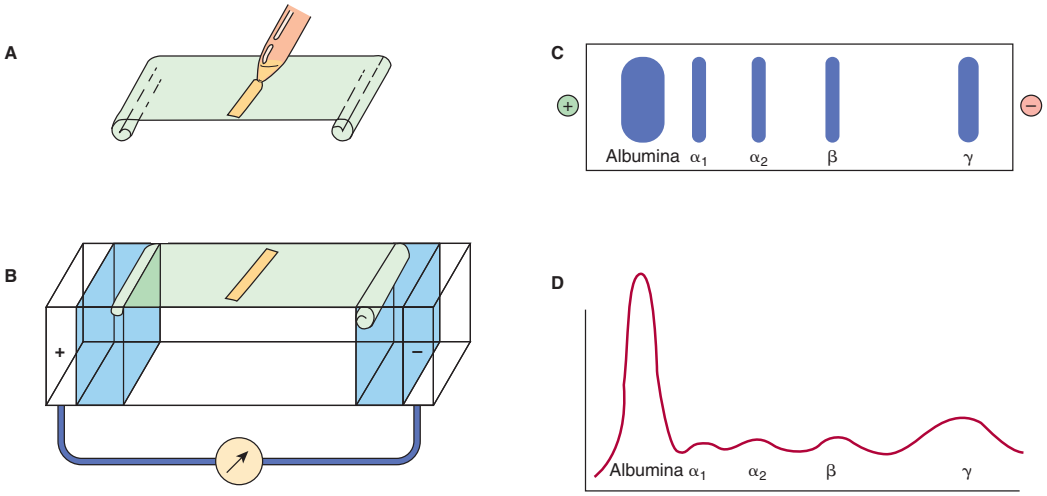


FIGURA 50-2 Técnica de eletroforese de zona em acetato de celulose. (**A**) Uma pequena quantidade de soro ou de outro líquido é aplicada a uma fita de acetato de celulose. (**B**) Efetua-se a eletrofose da amostra em tampão eletrolítico. (**C**) As bandas separadas de proteína são visualizadas nas condições características após a sua coloração. (**D**) A varredura densitométrica da fita de acetato de celulose converte as bandas em picos característicos de albumina, α_1-globulina, β_2-globulina, β-globulina e γ-globulina. (Reproduzida, com autorização, de Parslow TG et al (editors): *Medical Immunology,* 10 th ed. McGraw-Hill, 2001.)

trica. Em muitas doenças, são encontradas alterações características nas quantidades de uma ou mais dessas cinco bandas.

A concentração de proteínas no plasma é importante na determinação da distribuição dos líquidos entre o sangue e os tecidos

Nas arteríolas, a **pressão hidrostática** é de cerca de 37 mmHg, à qual se opõe uma pressão intersticial (tecidual) de 1 mmHg. A **pressão osmótica** (pressão oncótica) exercida pelas proteínas plasmáticas é de aproximadamente 25 mmHg. Portanto, uma força externa efetiva de cerca de 11 mmHg propele o líquido para dentro dos espaços intersticiais. Nas vênulas, a pressão hidrostática é em torno de 17 mmHg, com pressões oncótica e intersticial iguais àquelas anteriormente mencionadas; assim, uma força efetiva de cerca de 9 mmHg atrai a água de volta à circulação. As pressões citadas são frequentemente designadas como **forças de Starling**. Se a concentração das proteínas plasmáticas estiver acentuadamente diminuída (p. ex., em consequência de grave desnutrição proteica), os líquidos não são atraídos de volta ao compartimento intravascular e acumulam-se nos espaços teciduais extravasculares, uma condição conhecida como **edema**. O edema tem muitas causas, entre as quais a deficiência de proteína é uma delas.

As proteínas plasmáticas foram extensamente estudadas

Devido à facilidade relativa com que podem ser obtidas, as proteínas plasmáticas têm sido extensamente estudadas tanto nos seres humanos quanto em animais. Existem informações consideráveis acerca da biossíntese, da renovação, da estrutura e das funções das principais proteínas plasmáticas. As alterações nas suas quantidades e no seu metabolismo em muitas doenças também foram investigadas. Nos últimos anos, muitos dos genes das proteínas plasmáticas foram clonados e as suas estruturas foram determinadas.

A preparação de **anticorpos** específicos para cada proteína plasmática facilitou enormemente o seu estudo, possibilitando a precipitação e o isolamento de proteínas puras a partir da mistura complexa encontrada nos tecidos ou no plasma. Além disso, o uso de **isótopos** possibilitou a determinação de suas vias de biossíntese e de suas taxas de renovação no plasma.

As generalizações descritas a seguir surgiram dos estudos das proteínas plasmáticas.

A maioria das proteínas plasmáticas é sintetizada no fígado

Essa generalização foi estabelecida com base em experimentos em animais (p. ex., hepatectomia) e pelo uso de preparações isoladas de fígado perfundido, de fragmentos hepáticos, de homogeneizados de fígado e de sistemas de tradução *in vitro* utilizando preparações de mRNA extraídas do fígado. Todavia, as γ-globulinas são sintetizadas pelos plasmócitos, e algumas proteínas plasmáticas são sintetizadas em outros locais, como as células endoteliais.

As proteínas plasmáticas geralmente são sintetizadas em polirribossomos ligados à membrana

Em seguida, para alcançar o plasma, essas proteínas seguem o trajeto da principal via secretora da célula (membrana do retículo endoplasmático rugoso → membrana do retículo endoplasmático liso → aparelho de Golgi → vesículas secretoras). Desse modo, a maioria das proteínas plasmáticas é sintetizada na forma de **pré-proteínas** e, inicialmente, contém peptídeos-sinal na extremidade aminoterminal (Capítulo 46). Essas proteínas são geralmente submetidas a várias modificações pós-tradução (proteólise, glicosilação, fosforilação, etc.) à medida que seguem o seu trajeto pela célula. Os tempos de trânsito pelo hepatócito, desde o seu local de síntese até o plasma, variam de 30 min até várias horas ou mais para determinadas proteínas.

A maioria das proteínas plasmáticas consiste em glicoproteínas

Consequentemente, as proteínas plasmáticas contêm, em geral, cadeias oligossacarídicas N-ou O-ligadas, ou ambas (Capítulo 47). A albumina representa a principal exceção, visto que ela não contém resíduos de açúcar. As cadeias oligossacarídicas desempenham várias funções (Tabela 47-2). A remoção dos resíduos terminais de ácido siálico de determinadas proteínas plasmáticas (p. ex., ceruloplasmina) mediante exposição à neuraminidase pode reduzir acentuadamente as suas meias-vidas no plasma (Capítulo 47).

Muitas proteínas plasmáticas exibem polimorfismo

O **polimorfismo** é um traço mendeliano ou monogênico encontrado na população em pelo menos dois fenótipos, e nenhum deles é raro (i.e., nenhum dos fenótipos ocorre com frequência < 1 a 2%). As substâncias do grupo sanguíneo ABO (Capítulo 52) são os exemplos mais conhecidos de polimorfismos humanos. As proteínas plasmáticas humanas que apresentam polimorfismo incluem a α_1-antitripsina, a haptoglobina, a transferrina, a ceruloplasmina e as imunoglobulinas. As formas polimórficas dessas proteínas podem ser diferenciadas por diferentes processos (p. ex., vários tipos de eletroforese ou focalização isoelétrica), em que cada forma pode exibir um padrão característico de migração. As análises desses polimorfismos humanos demonstraram ter interesse genético, antropológico e clínico.

Cada proteína plasmática tem meia-vida característica na circulação

A **meia-vida** de uma proteína plasmática pode ser determinada pela marcação da proteína pura isolada com I^{131} ou Cr^{51} em condições favoráveis que não acarretam em desnaturação. A proteína marcada separa-se do isótopo livre não ligado, e a sua atividade específica (desintegrações por minuto por miligrama de proteína) é determinada. Em seguida, injeta-se uma quantidade conhecida da proteína radioativa em um adulto normal, e são obtidas amostras de sangue em vários intervalos para a determinação da radioatividade. Os níveis de radioatividade são representados graficamente em relação ao tempo, e a meia-vida da proteína (i.e., o tempo necessário para que a radioatividade decline de seu valor máximo para metade deste valor) pode ser calculada a partir do gráfico resultante, descontando-se o tempo necessário para que a proteína injetada entre em equilíbrio (misture-se) no sangue e nos espaços extravasculares. Nos adultos saudáveis normais, as meias-vidas obtidas para a albumina e para a haptoglobina são de cerca de 20 e 5 dias, respectivamente. Em algumas doenças, a meia-vida de uma proteína pode estar acentuadamente alterada. Por exemplo, em algumas doenças gastrintestinais, como a ileíte

regional (doença de Crohn), pode ocorrer perda de quantidades consideráveis de proteínas plasmáticas no intestino, incluindo albumina, por meio da mucosa intestinal inflamada. Os pacientes com essa doença apresentam **gastroenteropatia perdedora de proteína**, e, nesses indivíduos, a meia-vida da albumina iodada injetada pode ser reduzida a apenas um dia.

Os níveis de certas proteínas plasmáticas aumentam durante estados inflamatórios agudos ou secundariamente a determinados tipos de lesão

Essas proteínas são designadas como "**proteínas de fase aguda**" (ou reagentes) e consistem na **proteína C reativa** (CRP, assim denominada pela sua reação com o polissacarídeo C dos pneumococos), α_1-antitripsina, haptoglobina, α_1-glicoproteína ácida e **fibrinogênio**. As elevações dos níveis dessas proteínas variam de apenas 50% até 1.000 vezes no caso da CRP. Em geral, os níveis dessas proteínas também estão elevados nos estados inflamatórios crônicos e em pacientes com câncer. Acredita-se que essas proteínas desempenhem um papel na resposta do organismo à inflamação. Por exemplo, a proteína C reativa pode estimular a via clássica do complemento (ver adiante), enquanto a α_1-antitripsina pode neutralizar certas proteases liberadas durante o estado inflamatório agudo. A CRP é usada como marcador de lesão tecidual, infecção e inflamação, e existe considerável interesse no seu uso como preditor de certos tipos de distúrbios cardiovasculares secundários à aterosclerose. A citocina (= proteína sintetizada por células que afeta o comportamento de outras células) interleucina-1 (IL-1), um polipeptídeo liberado pelas células fagocíticas mononucleares, constitui o principal – mas não o único – fator estimulador da síntese da maioria dos reagentes de fase aguda pelos hepatócitos. Outras moléculas, como a IL-6, também estão envolvidas, e, assim como a IL-1, elas também parecem atuar em nível da transcrição gênica.

O **fator nuclear kappa-B** (**NFκB**) é um fator de transcrição envolvido na estimulação da síntese de algumas proteínas de fase aguda. Esse fator importante também participa na expressão de muitas citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão celular implicadas nos fenômenos imunológicos. Normalmente, esse fator está presente em sua forma inativa no citosol, mas é ativado e transferido para o núcleo pela ação de diversas moléculas (p. ex., interleucina-1) produzidas em certos processos, como inflamação, infecção e lesão por radiação.

A **Tabela 50-2** fornece um resumo das funções de muitas das proteínas plasmáticas. O restante deste capítulo fornece informações básicas relativas a determinadas proteínas plasmáticas selecionadas: albumina, haptoglobina, transferrina, ceruloplasmina, α_1-antitripsina, α_2-macroglobulina, as imunoglobulinas e o sistema complemento. As lipoproteínas são discutidas no Capítulo 25. Novas informações sobre as proteínas plasmáticas e suas variantes (incluindo aquelas descritas neste capítulo) estão surgindo constantemente, à medida que são aplicadas técnicas de proteômica para o seu estudo, particularmente novos métodos sensíveis de sequenciamento das proteínas por espectrometria de massa (ver Capítulo 4). Vários laboratórios estão se empenhando para estabelecer o **proteoma humano** completo das **proteínas plasmáticas**. Acredita-se que isso irá esclarecer **variações genéticas** nos seres humanos e também irá fornecer muitos **biomarcadores novos** que irão ajudar no diagnóstico de muitas doenças.

TABELA 50-2 Algumas funções das proteínas plasmáticas

Função	Proteínas plasmáticas
Antiproteases	Antiquimotripsina α_1-Antitripsina (α_1-antiproteinase) α_2-Macroglobulina Antitrombina
Coagulação sanguínea	Vários fatores da coagulação, fibrinogênio
Enzimas	Atuação no sangue, por exemplo, fatores da coagulação, colinesterase Extravasamento das células ou dos tecidos, por exemplo, aminotransferases
Hormônios	Eritropoietina[1]
Defesa imune	Imunoglobulinas, proteínas do complemento e β_2-microglobulina
Participação nas respostas inflamatórias	Proteínas da resposta de fase aguda (p. ex., proteína C reativa, α_1-glicoproteína ácida [orosomucoide])
Oncofetal	α_1-Fetoproteína (AFP)
Proteínas de transporte ou de ligação	Albumina (vários ligantes, incluindo bilirrubina, ácidos graxos livres, íons [Ca^{2+}], metais [p. ex., Cu^{2+}, Zn^{2+}], met-heme, esteroides, outros hormônios e uma variedade de fármacos) Ceruloplasmina (contém Cu^{2+}; a albumina provavelmente mais importante no transporte fisiológico do Cu^{2+}) Globulina de ligação dos corticosteroides (transcortina) (liga-se ao cortisol) Haptoglobina (liga-se à hemoglobina extracorpuscular) Lipoproteínas (quilomícrons, VLDL, LDL, HDL) Hemopexina (liga-se ao heme) Proteína de ligação do retinol (liga-se ao retinol) Globulina de ligação dos hormônios sexuais (liga-se à testosterona e ao estradiol) Globulina de ligação aos hormônios tireoidianos (liga-se à T_4 e T_3) Transferrina (transporta o ferro) Transtirretina (anteriormente pré-albumina; liga-se à T_4 e forma um complexo com a proteína de ligação do retinol)

[1]Vários outros hormônios proteicos circulam no sangue, porém não são normalmente designados como proteínas plasmáticas. De modo semelhante, a ferritina também é encontrada no plasma em pequenas quantidades, porém muitas vezes não é caracterizada como proteína plasmática.

(Um biomarcador é definido como característica objetivamente medida e avaliada como indicador de processos biológicos normais, processos patológicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica.)

A albumina é a principal proteína do plasma humano

A albumina (69 kDa) é a principal proteína do plasma humano (3,4 a 4,7 g/dL) e representa cerca de 60% das proteínas plasmáticas totais. Aproximadamente 40% da albumina estão presentes no plasma, enquanto os 60% restantes são encontrados no espaço

extracelular. O fígado sintetiza cerca de 12 g de albumina por dia, o que representa aproximadamente 25% da síntese hepática total de proteínas e metade de suas proteínas secretadas. Inicialmente, a albumina é sintetizada como **pré-pró-proteína**. Seu **peptídeo sinal** é removido quando a albumina entra nas cisternas do retículo endoplasmático rugoso, e um **hexapeptídeo** localizado na extremidade aminoterminal resultante é subsequentemente privado ao longo da via secretora (ver Figura 46-12). A síntese de albumina encontra-se diminuída em uma variedade de doenças, particularmente as que acometem o fígado. O plasma de pacientes com **doença hepática** frequentemente apresenta uma redução da razão entre albumina e globulinas (razão albumina-globulina diminuída). A síntese de albumina diminui de modo relativamente precoce em condições de desnutrição proteica, como o *kwashiorkor*.

A albumina humana madura consiste em uma cadeia polipeptídica de 585 aminoácidos com 17 pontes dissulfeto. Com o uso de proteases, a albumina pode ser subdividida em três **domínios** que desempenham funções distintas. A albumina tem um formato elipsoide, portanto, ela não aumenta tanto a viscosidade do plasma quanto uma molécula alongada, como o fibrinogênio. Em virtude de sua massa molecular relativamente baixa (em torno de 69 kDa) e de sua alta concentração, acredita-se que a albumina seja responsável por 75 a 80% da **pressão osmótica** do plasma humano. Estudos com eletroforese demonstraram que o plasma de alguns seres humanos carece de albumina. O distúrbio apresentado por esses indivíduos é denominado **analbuminemia**. Uma das causas da analbuminemia consiste em uma mutação que afeta o *splicing*. Os indivíduos com analbuminemia apresentam apenas edema moderado, embora a albumina seja o principal determinante da pressão osmótica do plasma. Acredita-se que as quantidades das outras proteínas plasmáticas aumentem, compensando a ausência da albumina.

Outra função importante da albumina é a sua capacidade de **ligação a vários ligantes**. Esses ligantes incluem ácidos graxos livres (AGL), cálcio, certos hormônios esteroides, bilirrubina e parte do triptofano plasmático. Além disso, a albumina parece desempenhar um importante papel no transporte do cobre nos seres humanos (ver adiante). Diversos fármacos, incluindo sulfonamidas, penicilina G, dicumarol e ácido acetilsalicílico ligam-se à albumina, e esse achado tem implicações farmacológicas importantes.

As preparações de albumina humana têm sido amplamente utilizadas no tratamento do choque hemorrágico e das queimaduras. Todavia, alguns estudos recentes questionaram o valor desse tratamento.

A haptoglobina liga-se à hemoglobina extracorpuscular, impedindo a entrada da hemoglobina livre nos rins

A **haptoglobina** (Hp) é uma glicoproteína plasmática que se liga à hemoglobina (Hb) extracorpuscular, formando um complexo firme não covalente (Hb-Hp). A quantidade de haptoglobina no plasma humano varia de 40 a 180 mg da capacidade de ligação da hemoglobina por decilitro. Cerca de 10% da hemoglobina degradada diariamente são liberados na circulação, constituindo, assim, a fração extracorpuscular. Os 90% restantes estão presentes nos eritrócitos senescentes e danificados, que são destruídos pelas células do sistema histiocitário. A massa molecular da hemoglobina é de aproximadamente 65 kDa, enquanto a da forma polimórfica mais simples da haptoglobina (Hp 1-1) encontrada nos seres humanos é de cerca de 90 kDa. Dessa forma, o complexo Hb-Hp apresenta massa molecular de cerca de 155 kDa. A hemoglobina livre atravessa os glomérulos renais e entra nos túbulos, onde tende a precipitar (como pode ocorrer após transfusão maciça de sangue incompatível, quando a capacidade de ligação da haptoglobina à hemoglobina é amplamente excedida) (**Figura 50-3**). Todavia, o complexo Hb-Hp é demasiado grande para atravessar os glomérulos. Por conseguinte, a função da Hp parece consistir em impedir a perda de hemoglobina livre nos rins – que conserva o ferro valioso presente na hemoglobina, que de outro modo seria perdido.

Nos seres humanos, a haptoglobina é encontrada em **três formas polimórficas**, conhecidas como Hp 1-1, Hp 2-1 e Hp 2-2. Na eletroforese em gel de amido, a Hp 1-1 migra formando uma banda única, enquanto a Hp 2-1 e a Hp 2-2 exibem padrões de bandas muito mais complexos. Dois genes, designados como Hp^1 e Hp^2, determinam esses três fenótipos, entre os quais a Hp 2-1 é o fenótipo heterozigoto. Foi sugerido que o polimorfismo da haptoglobina pode estar associado à prevalência de muitas doenças inflamatórias.

Os níveis de haptoglobina no plasma humano variam e têm algum valor diagnóstico. São encontrados baixos níveis de haptoglobina em pacientes com **anemias hemolíticas**. Esse achado é explicado pelo fato de que, enquanto a meia-vida da haptoglobina é de cerca de cinco dias, a meia-vida do complexo Hb-Hp é de aproximadamente 90 min, sendo rapidamente removido do plasma pelos hepatócitos. Consequentemente, quando a haptoglobina está ligada à hemoglobina, ela é depurada do plasma com velocidade cerca de 80 vezes maior do que a normal. Por esse motivo, o nível de haptoglobina declina rapidamente em situações nas quais a hemoglobina é liberada constantemente dos eritrócitos, conforme observado nas anemias hemolíticas. A haptoglobina é uma proteína de fase aguda, e seu nível plasmático apresenta-se elevado em uma variedade de estados inflamatórios.

A **proteína relacionada com a haptoglobina** é outra proteína encontrada no plasma humano. Exibe alto grau de homologia com a haptoglobina e parece ligar-se à hemoglobina. Seus níveis estão elevados em alguns pacientes com câncer, porém o significado disto ainda não foi esclarecido.

Algumas outras proteínas plasmáticas **ligam-se ao heme** mas não à hemoglobina. A **hemopexina** é uma β_1-globulina que se liga ao heme livre. A **albumina** liga-se a algumas moléculas de met-heme (heme férrico), formando metemalbumina, que, em seguida, transfere o met-heme para a hemopexina.

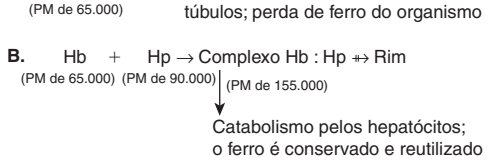


FIGURA 50-3 Diferentes destinos da hemoglobina livre e do complexo hemoglobina-haptoglobina.

O FERRO, CONSTITUINTE MUITO IMPORTANTE DO CORPO, É CUIDADOSAMENTE CONSERVADO

A **transferrina** é uma proteína plasmática importante envolvida no transporte do ferro. Antes de ser feita a descrição da transferrina e de várias outras proteínas envolvidas na homeostasia do ferro, serão considerados certos aspectos do ferro e de seu metabolismo.

O **ferro** é importante para o organismo humano devido à sua ocorrência em muitas hemoproteínas, como a hemoglobina, a mioglobina e os citocromos (incluindo o grupo de enzimas do citocromo P450). Um homem adulto normal de 70 kg tem 3 a 4 g de ferro no organismo, cuja distribuição é apresentada na **Tabela 50-3**. Em condições normais, o corpo conserva cuidadosamente o seu conteúdo de ferro. Um homem adulto saudável perde apenas cerca de 1 mg/dia, substituído pela absorção intestinal de ferro. As mulheres adultas (pré-menopáusicas) necessitam de cerca de 1,5 mg/dia e estão mais sujeitas a desenvolver estados de deficiência de ferro, devido à perda de sangue durante a menstruação.

TABELA 50-3 Distribuição do ferro em um homem adulto de 70 kg[1]

Transferrina	3 a 4 mg
Hemoglobina dos eritrócitos	2.500 mg
Na mioglobina e em várias enzimas	300 mg
Nas reservas (ferritina)	1.000 mg
Absorção	1 mg/dia
Perdas	1 mg/dia

[1]Em uma mulher adulta de peso semelhante, as reservas geralmente seriam menores (100 a 400 mg), e as perdas, maiores (1,5 a 2 mg/dia).

A absorção do ferro alimentar ocorre no duodeno

O ferro é ingerido na alimentação sob a forma de ferro hêmico ou não hêmico. A absorção de ferro pelos enterócitos no duodeno proximal é um processo rigorosamente controlado (**Figura 50-4**). O **ferro inorgânico alimentar** no estado férrico (Fe^{3+}) é reduzido à sua forma ferrosa (Fe^{2+}) por uma ferrirredutase ligada à membrana da borda em escova, o **citocromo b duodenal** (**Dcytb**). A vitamina C, o ácido gástrico e vários outros agentes redutores presente nos alimentos também podem favorecer a redução do ferro férrico ao ferro ferroso. A transferência do ferro pela membrana apical dos enterócitos é efetuada por um **transportador de metais divalentes 1** (**DMT1** ou **SLC11A2**). O DMT1 é relativamente inespecífico e também pode estar envolvido no transporte de outros cátions divalentes, como Mn^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} e Pb^{2+}. Uma vez no interior dos enterócitos, o ferro pode ser armazenado na forma de **ferritina**, ou pode ser transferido pela membrana basolateral para a circulação pela proteína exportadora de ferro, a **ferroportina** ou **proteína de regulação do ferro 1** (**IREG1** ou **SCL40A1**). Esse processo ocorre em associação à **hefaestina**, uma ferroxidase contendo ferro, homóloga à ceruloplasmina, que oxida a Fe^{2+} a Fe^{3+}. O ferro é transportado no plasma na forma Fe^{3+} pela proteína de transporte, a **transferrina**. O ferro em excesso armazenado nos enterócitos como ferritina é perdido quando os enterócitos descamam no lúmen intestinal.

O **ferro hêmico** na alimentação é captado pelos enterócitos por mecanismos independentes daqueles envolvidos na captação do ferro inorgânico. O heme nos enterócitos é degradado pela heme-oxigenase (HO, ver Capítulo 31), liberando o ferro, que é armazenado na forma de ferritina ou transportado na circulação pela ferroportina.

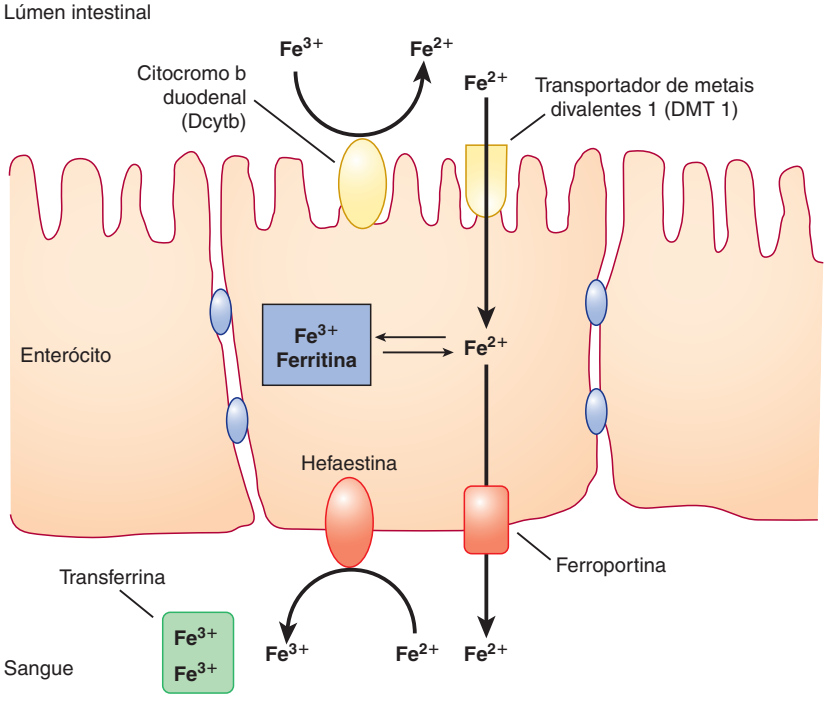


FIGURA 50-4 Transporte do ferro não hêmico nos enterócitos. O ferro férrico é reduzido à forma ferrosa por uma ferrirredutase luminal, o citocromo b duodenal (Dcytb). O ferro na forma ferrosa é transportado nos enterócitos pelo transportador de metais divalentes 1 (DMT-1). No interior do enterócito, o ferro é armazenado como ferritina ou transportado para fora da célula, por meio da membrana basolateral, pela ferroportina (Fp). O ferro ferroso é oxidado à sua forma férrica pela ferroxidase, a hefaestina. Em seguida, a transferrina liga-se ao ferro férrico no sangue, transportando-o para vários locais do organismo. (Com base em Andrews NC: Forging a field: the golden age of iron biology. Blood 2008;112(2):219.)

FIGURA 50-5 A reação de Fenton. O ferro livre é extremamente tóxico, visto que pode catalisar a formação de radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) a partir do peróxido de hidrogênio (ver também Capítulo 52). O radical hidroxila é uma espécie transitória, porém altamente reativa, que pode oxidar macromoléculas celulares com consequente lesão tecidual.

A transferrina transporta o ferro até os locais onde ele é necessário

O ferro livre é extremamente tóxico, em virtude de sua capacidade de catalisar a formação de radicais livres de oxigênio prejudiciais por meio da reação de Fenton (**Figura 50-5**). Nos sistemas biológicos, o ferro está sempre ligado às proteínas para limitar a produção de radicais tóxicos. No plasma, o ferro está firmemente ligado à **transferrina** (**Tf**), proteína plasmática que desempenha um papel central no transporte do ferro pelo corpo até os locais onde ele é necessário. Trata-se de uma β_1-globulina com massa molecular de aproximadamente 76 kDa. A transferrina é uma glicoproteína sintetizada pelo fígado e transporta o ferro na circulação até os locais onde ele é necessário (p. ex., a medula óssea). Possui dois sítios de ligação de alta afinidade para o ferro na forma Fe^{3+}. A transferrina, quando ligada a dois átomos de ferro, é denominada **holotransferrina** (**Tf-Fe**). A concentração plasmática de Tf é de aproximadamente 300 mg/dL. Essa quantidade de transferrina pode ligar-se a aproximadamente 300 μg de ferro (por decilitro de plasma). Isso constitui a **capacidade total de ligação do ferro** (**CTLF**) do plasma. Em condições normais, a transferrina está aproximadamente **30% saturada** com ferro. A saturação da transferrina cai para menos de 16% na deficiência grave de ferro e pode aumentar para mais de 45% em condições de sobrecarga de ferro.

A glicosilação da transferrina está comprometida nos **distúrbios congênitos da glicosilação** (Capítulo 47) e no **alcoolismo crônico**, resultando em níveis circulantes elevados de **transferrina deficiente em carboidratos** (**CDT**). A CDT pode ser medida por focalização isoelétrica (IEF) e é usada como marcador de alcoolismo crônico.

O ciclo da transferrina ajuda a captação celular de ferro

O **receptor de transferrina 1** (**TfR1**) está presente na superfície de quase todas as células, particularmente os precursores eritroides na medula óssea. A transferrina liga-se a esses receptores e é internalizada por endocitose mediada pelo receptor (à semelhança dos receptores de LDL descritos no Capítulo 25). O pH existente no interior do endossomo tardio provoca a dissociação do ferro da transferrina (Tf). O ferro dissociado sai do endossomo por meio do DMT1 e passa para o citoplasma. Diferentemente do componente proteico das LDL, a apoTf (a Tf sem ferro ligado) não é degradada dentro do endossomo; em vez disso, ela permanece associada a seu receptor e retorna à membrana plasmática. Em seguida, pode se dissociar do receptor, retornar ao plasma e captar mais ferro para o seu transporte até as células, constituindo o denominado **ciclo da transferrina** (**Figura 50-6**).

O **receptor de transferrina 2** (**TfR2**) é expresso principalmente na superfície dos hepatócitos, bem como nas células das criptas do intestino delgado. Apresenta baixa afinidade pela Tf-Fe e não parece estar envolvido na captação de ferro pelas células. Desempenha um papel como sensor das reservas corporais de ferro em associação a outras proteínas, conforme discutido adiante.

O ferro nos eritrócitos senescentes é reciclado pelos macrófagos

Normalmente, os eritrócitos têm um tempo de sobrevida de cerca de 120 dias. Os eritrócitos senescentes ou danificados são fagocitados por macrófagos do sistema reticuloendotelial (SRE) presente no baço e no fígado. Cerca de 200 bilhões de eritrócitos (em cerca de 40 mL de sangue) são catabolizados diariamente dessa maneira. No interior do macrófago, o heme proveniente da hemoglobina é degradado pela **heme-oxigenase**, que o converte em biliverdina. Ocorre liberação de monóxido de carbono e de ferro como subprodutos. O ferro liberado do heme é exportado da vesícula fagocítica no macrófago pela **NRAMP 1** (proteína do macrófago associada à resistência natural 1), um transportador homólogo ao DMT1. Em seguida, é transportado na circulação pela ferroportina na membrana plasmática do macrófago (**Figura 50-7**). Portanto, a ferroportina desempenha um papel central, não apenas na absorção de ferro pelo intestino, mas também na sua liberação dos macrófagos. A **ceruloplasmina** (ver adiante) é uma proteína plasmática contendo cobre que é sintetizada pelo fígado. Possui atividade de ferroxidase. A ceruloplasmina é necessária para a oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+}. Em seguida, o Fe^{3+} liga-se à transferrina no sangue. O ferro liberado dos macrófagos por esse processo (cerca de 25 mg por dia) é reciclado e representa a principal fonte de ferro do organismo. Em comparação, a absorção intestinal de ferro contribui com apenas 1 a 2 mg das necessidades corporais diárias de ferro.

A ferritina armazena o ferro nas células

Em circunstâncias normais, a **ferritina** armazena o ferro em excesso em vários tecidos e representa aproximadamente 1 g do conteúdo corporal total de ferro. A ferritina tem massa molecular de aproximadamente 440 kDa e é composta por 24 subunidades, que circundam 3.000 a 4.500 átomos de ferro. A subunidade pode ser do tipo H (pesada) ou L (leve). A subunidade H exibe atividade de ferroxidase, que é necessária para a ligação do ferro à ferritina. A função da subunidade L não está claramente estabelecida, porém foi sugerido que ela desempenha um papel na nucleação e estabilidade da ferritina. Em condições normais, existe uma pequena quantidade de ferritina no plasma humano (50 a 200 μg/dL) proporcional às reservas totais de ferro do organismo. Nessas condições, os níveis plasmáticos de ferritina são considerados como um **indicador das reservas corporais de ferro**. Entretanto, não se sabe se a ferritina presente no plasma provém de células lesionadas ou se ela é ativamente secretada pelas células.

A **hemossiderina** é uma molécula pouco definida, que parece ser uma forma parcialmente degradada da ferritina contendo ferro. Pode ser detectada nos tecidos em condições de sobrecarga de ferro (**hemossiderose**) por corantes histológicos (p. ex., azul da Prússia).

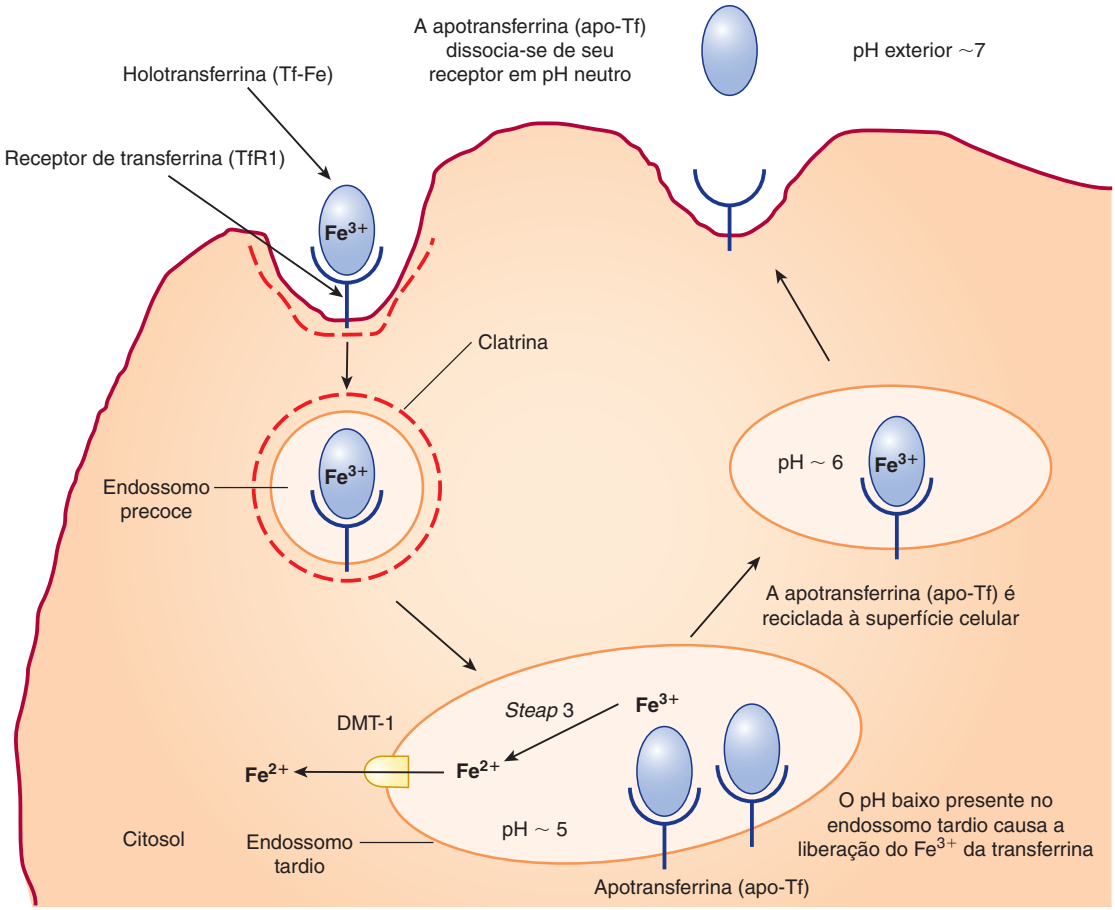


FIGURA 50-6 O ciclo da transferrina. A holotransferrina (Tf-Fe) liga-se ao receptor de transferrina 1 (TfR1) presente em depressões revestidas de clatrina na superfície celular. O complexo TfR1-Tf-Fe sofre endocitose, e as vesículas endocíticas fundem-se para formar os endossomos precoces. Estes endossomos precoces amadurecem em endossomos tardios, cujo interior tem pH ácido. O pH baixo causa a liberação de ferro dos sítios de ligação da transferrina. A apotransferrina (apo-Tf) permanece ligada ao TfR1. O ferro férrico é convertido em sua forma ferrosa pela ferrir-redutase, *Steap* 3. Em seguida, o ferro em sua forma ferrosa é transportado para o citosol pelo DMT1. O complexo TfR1-apo-Tf é reciclado de volta à superfície celular. Na superfície celular, a apo-Tf é liberada do TFR1. Em seguida, o TfR1 liga-se a uma nova Tf-Fe. Esta etapa completa o ciclo da transferrina. (Com base na Figura 17-48 em Lodish H et al: *Molecular Cell Biology,* 4th ed. WH Freeman, 2000.)

A homeostasia intracelular do ferro é rigorosamente regulada

A síntese de TfR1 e da ferritina estão ligadas de modo recíproco ao conteúdo intracelular de ferro. Quando os níveis de ferro estão elevados, a ferritina é sintetizada para armazenar o ferro, e, como não há necessidade de captação adicional de ferro, a síntese do TfR1 é inibida. Em contrapartida, quando os níveis de ferro estão baixos, a ferritina não é sintetizada enquanto ocorre síntese de TfR1 para promover a captação de ferro a partir da transferrina no sangue.

Os mecanismos envolvidos na regulação da síntese da ferritina e do TfR1 foram elucidados (**Figura 50-8**). Esses mecanismos operam por meio da regulação da estabilidade dos mRNAs para a ferritina e o TfR1. Os mRNAs da ferritina e do TfR1 contêm **elementos de resposta ao ferro** (**IRE**), que formam alças em grampo em suas regiões não traduzidas (UTR) 5′ e 3′, respectivamente. Os IRE estão ligados a **proteínas reguladoras do ferro** (**IRP**). As IRP são sensíveis aos níveis intracelulares de ferro e são induzidas pela presença de baixos níveis do metal. Ligam-se aos IRE apenas quando os níveis intracelulares de ferro estão baixos. A ligação da IRP ao IRE na 3′ UTR do mRNA do TfR1 estabiliza esse mRNA, aumentando, assim, a síntese de TfR1 e a sua expressão na superfície celular. Por outro lado, a ligação da IRP ao IRE na 5′ UTR do mRNA da ferritina bloqueia a tradução da ferritina. Do mesmo modo, na ausência de ligação da IRP ao IRE (que ocorre na presença de altos níveis de ferro), a tradução do mRNA da ferritina é facilitada, e o mRNA do TfR1 é rapidamente degradado. O resultado final é que, quando os níveis intracelulares de ferro estão elevados, a ferritina é sintetizada, mas não o TfR1, ao passo que, quando os níveis intracelulares de ferro estão baixos, ocorre síntese do TfR1, mas não da ferritina. Isso fornece um exemplo clássico de controle da expressão das proteínas em nível traducional.

A hepcidina constitui o principal regulador da homeostasia sistêmica do ferro

A **hepcidina** é uma proteína que desempenha um papel central na homeostasia do ferro no organismo. É sintetizada pelo fígado como uma proteína precursora de 84 aminoácidos (pró-hepcidina). A pró-hepcidina é clivada, gerando a hepcidina bioativa,

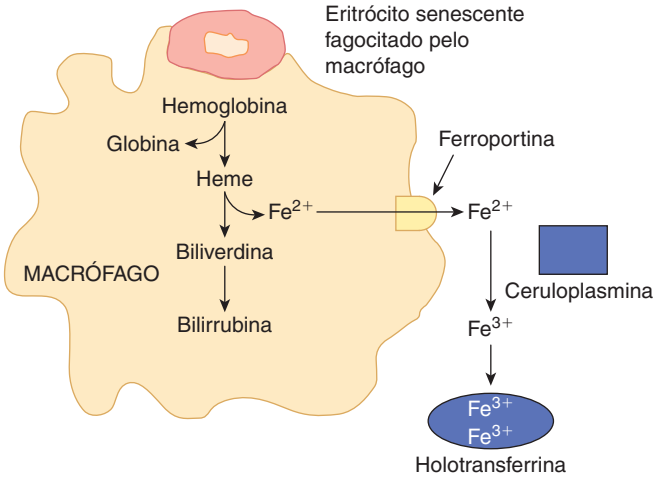


FIGURA 50-7 Reciclagem do ferro nos macrófagos. Os eritrócitos senescentes são fagocitados pelos macrófagos. A hemoglobina é degradada, e o ferro é liberado do heme pela ação da enzima heme oxigenase. O ferro na forma ferrosa é então transportado para fora do macrófago pela ferroportina (Fp). No plasma, é oxidado à forma férrica pela ceruloplasmina antes de sua ligação à transferrina (Tf). No sangue, o ferro circula firmemente ligado à Tf.

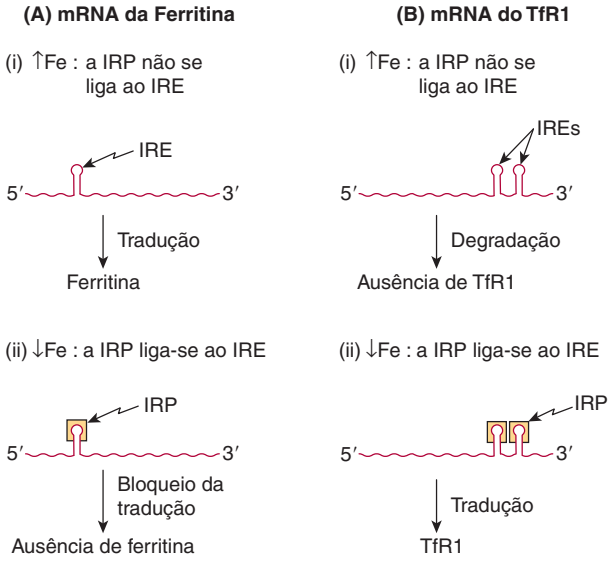


FIGURA 50-8 Representação esquemática da relação recíproca entre a síntese de ferritina e o receptor de transferrina (TfR1). O mRNA para a ferritina está representado à esquerda, enquanto o do TfR1 está representado à direita do diagrama. Na presença de altas concentrações de ferro, o ferro ligado à IRP impede a ligação dos IRE em qualquer tipo de mRNA. O mRNA da ferritina pode ser traduzido nessas circunstâncias, e ocorre síntese de ferritina. Por outro lado, quando a IRP é incapaz de se ligar ao IRE no mRNA para o TfR1, este mRNA sofre degradação. Por outro lado, na presença de baixas concentrações de ferro, a IRP pode ligar-se aos IRE em ambos os tipos de mRNA. No caso do mRNA da ferritina, isso impede a sua tradução. Em consequência, não há síntese de ferritina. No caso do mRNA para o TfR1, a ligação da IRP impede a degradação do mRNA, que é traduzido, com síntese de TfR1. IRP, proteína reguladora do ferro; IRE, elemento de resposta ao ferro.

um peptídeo de 25 aminoácidos. **A hepcidina liga-se ao exportador de ferro celular, a ferroportina, e desencadeia a sua internalização e degradação.** Logo, como mostra a **Figura 50-9,** a hepcidina diminui a absorção de ferro no intestino (produzindo um "bloqueio da mucosa") e também impede a reciclagem do ferro dos macrófagos. Esses efeitos resultam em diminuição dos níveis circulantes de ferro (hipoferremia). Além disso, diminui a transferência placentária de ferro (não ilustrada na Figura 50-9). Quando os níveis plasmáticos de ferro estão elevados, a síntese hepática de hepcidina aumenta, reduzindo, assim, a absorção do ferro e a reciclagem de ferro dos macrófagos. Observa-se o processo oposto quando os níveis plasmáticos de ferro estão baixos.

A expressão da hepcidina no fígado é um processo altamente regulado, do qual muitos aspectos ainda se encontram em fase de investigação. A expressão da hepcidina é regulada pela disponibilidade sistêmica de ferro, pela eritropoiese, inflamação e hipoxia, entre outros sinais. Estudos realizados em pacientes com hemocromatose hereditária (descrita adiante e no Caso 10 do Capítulo 57) forneceram uma grande quantidade de informações sobre a regulação da hepcidina.

Os hepatócitos possuem um "complexo sensor de ferro" em sua superfície. Esse complexo é constituído por várias proteínas (ver **Figura 50-10**), as quais são a **proteína HFE** (que mais comumente sofre mutação na hemocromatose hereditária), o **TfR1,** o **TfR2** e a **hemojuvelina** (**HJV**). A proteína HFE é uma molécula semelhante ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) da classe 1, expressa na superfície celular, ligada à **β_2-microglobulina** (componente das moléculas MHC da classe I, não indicado Figura 50-10) e ao TfR1. A proteína HFE liga-se ao TfR1 em um sítio que se sobrepõe a seu sítio de ligação para a holotransferrina (TfFe). Por conseguinte, a Tf-Fe compete com a HFE pela sua ligação ao TfR1. Quando deslocada do TfR1 pela Tf-Fe (o que ocorre quando os níveis de Tf-Fe estão elevados), a HFE liga-se ao TfR2, que também está expresso na superfície dos hepatócitos. O complexo HFE-TfR2 é ainda mais estabilizado pela sua ligação à Tf-Fe. Esse complexo desencadeia uma cascata de sinalização intracelular, que acaba resultando em *up-regulation* da expressão do gene da hepcidina (*HAMP*). Os papéis cruciais da HFE, da HJV e do TfR2 na regulação da hepcidina são demonstrados pelo fato de que as mutações de seus genes (como as mutações no *HAMP*) caracterizam-se por baixos níveis circulantes de hepcidina e sobrecarga de ferro.

As **proteínas morfogenéticas do osso** (**BMP**), **particularmente a BMP6**, desempenham um importante papel na regulação da expressão basal da hepcidina. As BMP atuam por mecanismos distintos da proteína HFE, porém existe uma considerável comunicação cruzada entre essas vias. Os níveis de BMP são regulados pelo ferro por meio de mecanismos que ainda não estão totalmente elucidados. A BMP liga-se a seus receptores (BMPR) de superfície celular. Essa ligação é facilitada pela HJV, que atua como correceptor da BMP. A ativação do complexo BMPR-HJV provoca a fosforilação de SMAD (proteínas de sinalização intracelular) (Figura 50-10), resultando, posteriormente, na ativação transcricional da hepcidina.

Os níveis de hepcidina também são regulados por **sinais eritropoiéticos.** Por exemplo, sabe-se que os níveis de hepcidina sofrem *down-regulation* na β-talassemia maior, que se caracteriza por eritropoiese ineficaz e sobrecarga de ferro. Recentemente,

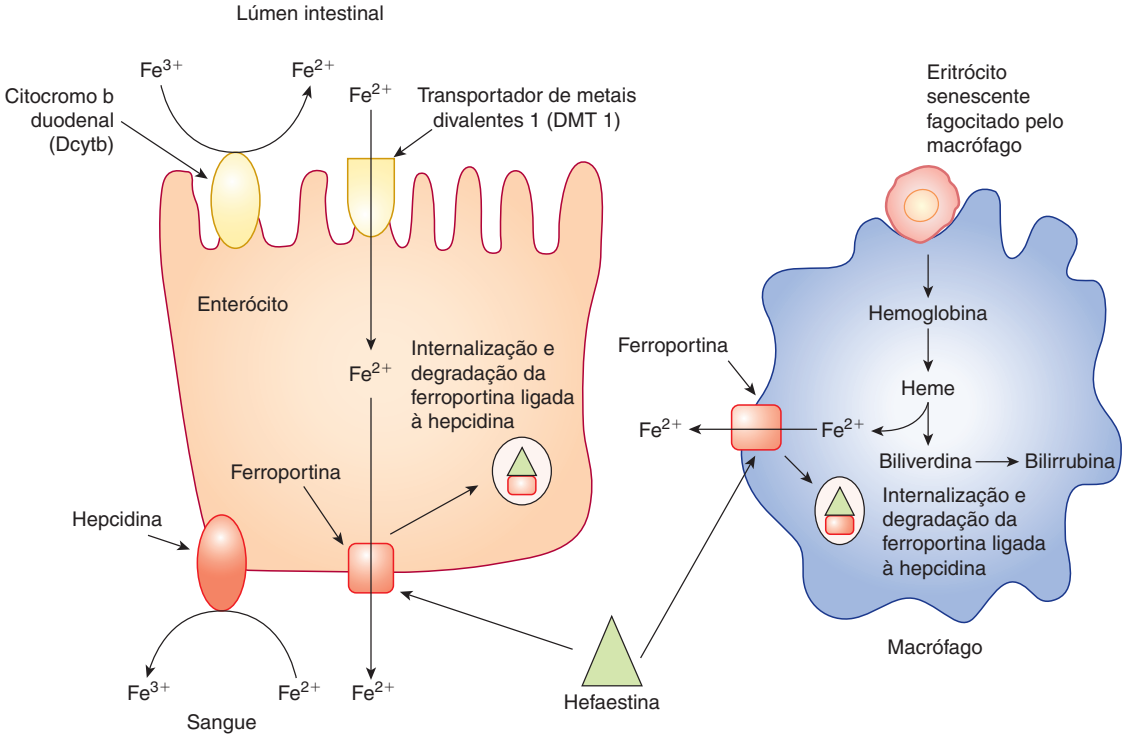


FIGURA 50-9 Papel da hepcidina na regulação sistêmica do ferro. A hepcidina liga-se à ferroportina expressa na superfície dos enterócitos e dos macrófagos e desencadeia a sua internalização e degradação. Isto diminui a absorção intestinal de ferro e inibe a liberação de ferro dos macrófagos, levando à hipoferremia. (Com base em Andrews NC: Forging a field: the golden age of iron biology. Blood 2008;112(2):219.)

foi constatado que o **fator de diferenciação do crescimento 15** (**GDF15**) e a **gastrulação torcida 1** (**TWSG1**) constituem moléculas críticas secretadas pelos eritroblastos. Essas moléculas causam *down-regulation* na expressão hepática da hepcidina na β-talassemia.

Sabe-se que a **inflamação** induz a expressão da hepcidina. A **interleucina-6** (**IL-6**), uma citocina inflamatória, sinaliza por meio da via JAK-STAT (Janus Quinase – Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição) para mediar esse efeito (Figura 50-10). A anemia associada à inflamação crônica (**anemia da inflamação ou AI**) é provavelmente causada pela *up-regulation* da hepcidina mediada pela inflamação. A AI manifesta-se como anemia microcítica hipocrômica refratária à suplementação de ferro. Além dos fatores assinalados anteriormente, sabe-se também que a **hipoxia** induz a hepcidina, e esse efeito é mediado pela estabilização dos fatores induzíveis por hipoxia 1 e 2 (HIF-1 e HIF-2).

A deficiência de ferro é altamente prevalente

A deficiência de ferro é extremamente comum em muitas partes do mundo, particularmente nos países em desenvolvimento. Existem **várias causas** para a deficiência de ferro. Nos países em desenvolvimento, o aporte diminuído de ferro na alimentação e a má absorção constituem as causas mais comuns. As mulheres pré-menopáusicas têm mais tendência a desenvolver deficiência de ferro, já que apresentam maior necessidade diária de ferro devido à perda de sangue durante a menstruação. As perdas crônicas de sangue, em decorrência de sangramento gastrintestinal ou de menstruação excessiva, também representam causas comuns de deficiência de ferro.

O **desenvolvimento** da anemia ferropriva ocorre em três estágios – balanço negativo do ferro, eritropoiese deficiente em ferro e, por fim, anemia ferropriva. O **balanço negativo de ferro** constitui o estágio inicial, em que a absorção intestinal de ferro não é suficiente para atender às demandas do organismo. Como consequência, ocorre mobilização das reservas corporais de ferro para suprir as necessidades. Essa mobilização leva a uma depleção progressiva das reservas de ferro. Nesse estágio, todos os exames laboratoriais estão normais, com exceção dos baixos níveis séricos de ferritina que, conforme descrito anteriormente, constituem um marcador das reservas corporais de ferro. Se essa situação persistir, há depleção das reservas de ferro, e os níveis séricos de ferritina caem abaixo de 15 μg/dL. Nessa etapa, os níveis de transferrina no sangue aumentam, resultando em elevação da **CTLF**. Entretanto, a **saturação da transferrina** diminui e pode cair para menos de 20%. Ocorre comprometimento na síntese de hemoglobina. Este é o estágio de **eritropoiese deficiente de ferro**. Se a deficiência de ferro não for corrigida nesse estágio, os níveis de hemoglobina no sangue começam a declinar gradualmente, resultando no estágio final de **anemia ferropriva**. Essa fase caracteriza-se por um **quadro hematológico microcítico hipocrômico**. Geralmente, os pacientes apresentam fadiga, palidez e redução da capacidade de exercício físico. A **Tabela 50-4** fornece um resumo das alterações observadas nos exames laboratoriais comuns em vários estágios de desenvolvimento da anemia ferropriva.

Os níveis de **protoporfirina eritrocitária** estão elevados na deficiência de ferro. A presença de protoporfirina nos eritrócitos reflete uma diminuição da incorporação do ferro catalisada pela ferroquelatase no anel de protoporfirina IX. A **proteína recepto-**

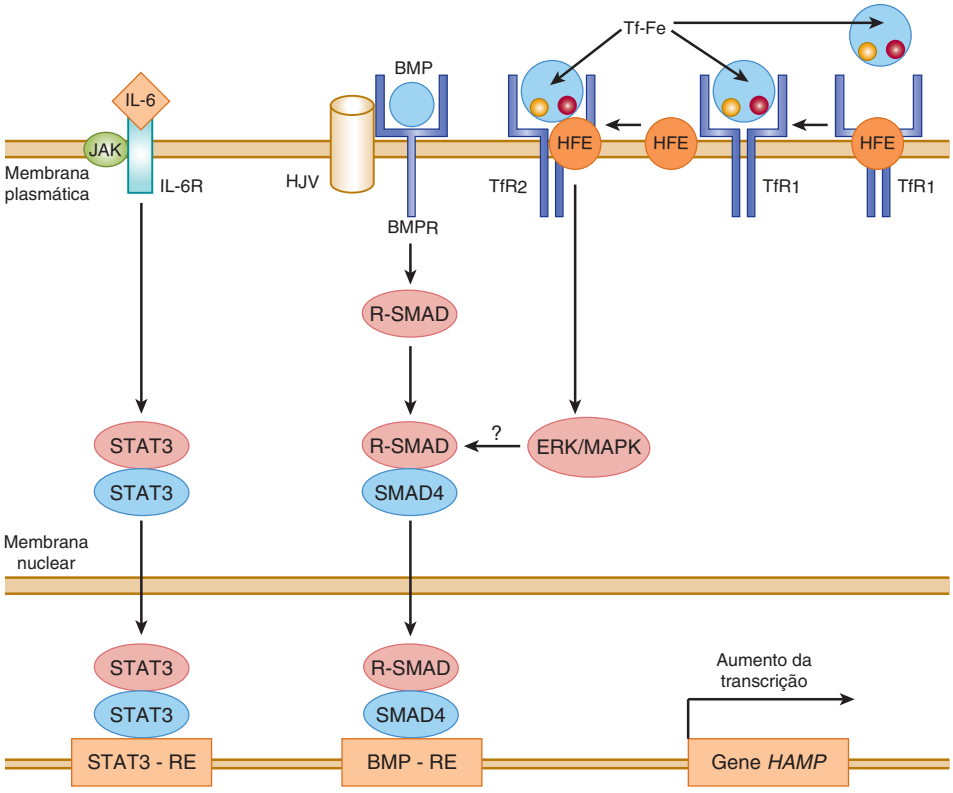


FIGURA 50-10 Regulação da expressão do gene da hepcidina. A Tf-Fe (holotransferrina) compete com a proteína HFE pela sua ligação ao TFR1. Os altos níveis de Tf-Fe deslocam a HFE de seu sítio de ligação no TfR1. A HFE deslocada liga-se ao TfR2 juntamente com Tf-Fe, sinalizando a via ERK/MAPK para induzir a hepcidina. A BMP liga-se a seu receptor BMPR e à HJV (correceptor) para ativar R-SMAD. R-SMAD sofre dimerização com SMAD4 e translocação para o núcleo, onde se liga ao BMP-RE, resultando em ativação transcricional da hepcidina, como mostra a figura. A IL-6, que é um biomarcador de inflamação, liga-se a seu receptor de superfície celular e ativa a via JAK-STAT. A STAT3 é translocada para o núcleo, onde se liga a seu elemento de resposta (STAT-RE) no gene da hepcidina para induzi-lo. BMP-RE, elemento de resposta da BMP; BMP, proteína morfogenética óssea; BMPR, receptor da proteína morfogenética óssea; ERK-MAPK, quinase extracelular regulada por sinal/proteinoquinase ativada por mitógeno; *HAMP*, gene que codifica o peptídeo antimicrobiano hepcidina (hepcidina); HJV, hemojuvenilina; IL-6, interleucina-6; IL-6R, receptor de interleucina-6; JAK, quinase associada à Janus; SMAD, proteína relacionada à Sma e MAD (*Mothers Against Decapentaplegic*); STAT, transdução de sinal e ativador da transcrição; STAT3-RE, elemento de resposta STAT3; TfR1, receptor de transferrina 1; TfR2, receptor de transferrina 2. (Redesenhada de Hentz MW, Muckenthaler UM, Gali B et al.: Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. Cell 2010;142:24.)

ra de transferrina do soro ou **receptor de transferrina solúvel** (**sTfR**) também é considerado um marcador útil de deficiência de ferro. Em condições normais, o TfR1 está altamente expresso na superfície das células eritroides, e certa proporção é liberada na circulação por clivagem proteolítica. Essa fração é designada como sTfR. O aumento dos níveis séricos de sTfR reflete uma expressão aumentada de TfR1 na superfície das células eritroides na deficiência de ferro. A estimativa do nível sérico de sTfR é par-

TABELA 50-4 Alterações nos vários exames laboratoriais empregados para a avaliação de anemia ferropriva

Parâmetro	Normal	Balanço negativo do ferro	Eritropoiese deficiente em ferro	Anemia ferropriva
Ferritina sérica (μg/dL)	50 a 200	Diminuída < 20	Diminuída < 15	Diminuída < 15
Capacidade total de ligação do ferro (CTLF) (μg/dL)	300 a 360	Ligeiramente aumentada > 360	Aumentada > 380	Aumentada > 400
Ferro sérico (μg/dL)	50 a 150	Normal	Diminuído < 50	Diminuído < 30
Saturação da transferrina (%)	30 a 50	Normal	Diminuída < 20	Diminuída < 10
Protoporfirina eritrocitária (μg/dL)	30 a 50	Normal	Aumentada	Aumentada
Receptor de transferrina solúvel (μg/dL)	4 a 9	Aumentado	Aumentado	Aumentado
Morfologia dos eritrócitos	Normal	Normal	Normal	Microcíticos hipocrômicos

Modificada, com autorização, da Figura 98-2, pág. 630, do Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th ed. Fauci AS et al. (editors). McGraw-Hill, 2008.

TABELA 50-5 Condições de sobrecarga de ferro

Hemocromatose hereditária
• Hemocromatose relacionada com HFE (tipo 1)
• Hemocromatose não relacionada com HFE ◦ Hemocromatose juvenil (tipo 2) ▪ Mutação da hepcidina (tipo 2A) ▪ Mutação da hemojuvelina (tipo 2B) ◦ Mutação do receptor de transferrina 2 (tipo 3) ◦ Mutação da ferroportina (tipo 4)
Hemocromatose secundária
• Anemia caracterizada por eritropoiese ineficaz (p. ex., talassemia maior)
• Transfusões sanguíneas repetidas
• Ferroterapia parenteral
• Sobrecarga alimentar de ferro (siderose de Bantu)
Diversas condições associadas à sobrecarga de ferro
• Hepatopatia alcoólica
• Esteato-hepatite não alcoólica
• Hepatite C

ticularmente útil para diferenciar a anemia ferropriva da anemia causada por inflamação crônica (AI, descrita anteriormente). Os níveis de sTfR estão elevados na anemia ferropriva, porém permanecem dentro da faixa de referência na anemia da inflamação crônica. Os níveis séricos de ferritina não têm utilidade nessa situação, visto que a ferritina, por ser uma proteína de fase aguda, aumenta durante a inflamação, mesmo na presença de anemia.

A hemocromatose hereditária caracteriza-se por sobrecarga de ferro

As condições de sobrecarga de ferro, também denominadas hemocromatose, caracterizam-se por absorção intestinal elevada de ferro, resultando em aumento das reservas corporais totais de ferro. O termo **hemossiderose** é usado para referir-se à presença de ferro corável nos tecidos, que frequentemente constitui uma característica das condições de sobrecarga de ferro.

A sobrecarga de ferro pode ser hereditária ou secundária (**Tabela 50-5**). A **hemocromatose hereditária** é causada, com mais frequência, por mutações do gene *HFE*. Formas mais raras dessa doença podem surgir devido a mutações dos genes da hepcidina (*HAMP*), TfR2, HJV e ferroportina. A **sobrecarga de ferro secundária** está geralmente associada à eritropoiese ineficaz, conforme observado nas síndromes de talassemia. As transfusões repetidas de sangue também podem resultar em sobrecarga progressiva de ferro. No Capítulo 57, são discutidos, no Caso 10, outros detalhes referentes às causas, à patogenia e às manifestações clínicas da hemocromatose hereditária.

A ceruloplasmina liga-se ao cobre, e os baixos níveis dessa proteína plasmática estão associados à doença de Wilson

A ceruloplasmina (com cerca de 160 kDa) é uma α_2-globulina. Apresenta coloração azulada, devido a seu alto teor de cobre, já que transporta 90% do cobre presente no plasma. Cada molécula de ceruloplasmina liga-se firmemente a seis átomos de cobre, de modo que o metal não seja facilmente intercambiável. A **albumina** transporta os 10% restantes do cobre plasmático, porém liga-se ao metal com menos afinidade do que a ceruloplasmina. Por isso, a albumina doa o seu cobre aos tecidos com mais facilidade do que a ceruloplasmina e parece ser mais importante do que esta última no transporte de cobre no organismo humano. A ceruloplasmina exibe atividade de **oxidase** dependente de cobre, porém a sua importância fisiológica ainda não foi esclarecida, exceto por sua possível participação na oxidação do Fe^{2+} da transferrina a Fe^{3+} (ver anteriormente). A quantidade de ceruloplasmina plasmática encontra-se diminuída na presença de doença hepática. Em particular, são observados baixos níveis de ceruloplasmina na **doença de Wilson** (degeneração hepatolenticular), doença causada pelo metabolismo anormal do cobre. Para facilitar a descrição da doença de Wilson, será analisado, em primeiro lugar, o **metabolismo do cobre** no corpo humano e, em seguida, a **doença de Menkes**, outro distúrbio caracterizado pelo metabolismo anormal do cobre.

O cobre é um cofator de determinadas enzimas

O **cobre** é um oligoelemento essencial, necessário na alimentação, pois atua como cofator de várias enzimas (ver **Tabela 50-6**). O cobre desempenha papéis importantes na respiração celular (citocromo *c* oxidase), na homeostasia do ferro (ceruloplasmina), na formação de melanina (tirosinase), na produção de neurotransmissores (várias enzimas), na síntese de tecido conectivo (lisil-oxidase) e na proteção contra oxidantes (p. ex., superóxido dismutase). O cobre aceita e doa elétrons e participa de reações envolvendo dismutação, hidroxilação e oxigenação. Todavia, **o cobre em excesso** pode causar problemas, visto que pode oxidar proteínas e lipídeos, ligar-se aos ácidos nucleicos e aumentar a produção de radicais livres. Logo, é importante a atuação de mecanismos para manter a quantidade de cobre corporal dentro dos limites normais. O corpo do adulto normal contém cerca de 100 mg de cobre, localizados principalmente nos ossos, no fígado, nos rins e no músculo. A ingestão diária de cobre é de cerca de 2 a 4 mg, e em torno de 50% são absorvidos no estômago e na porção proximal do intestino delgado, enquanto o restante é excretado nas fezes. O cobre é transportado até o fígado **ligado à albumina**, é captado pelos hepatócitos e parte é excretada na bile. O cobre também sai do fígado ligado à **ceruloplasmina**, que é sintetizada nesse órgão.

Os níveis teciduais de cobre e de alguns outros metais são regulados em parte por metalotioneínas

As **metalotioneínas** constituem um grupo de proteínas pequenas (cerca de 6,5 kDa) encontradas no citosol das células, particular-

TABELA 50-6 Algumas enzimas importantes que contêm cobre

Amina oxidase
Superóxido dismutase dependente de cobre
Citocromo-oxidase
Tirosinase

mente no fígado, nos rins e no intestino. Essas proteínas apresentam alto teor de cisteína e podem **ligar-se ao cobre**, **zinco**, **cádmio** e **mercúrio**. Os grupos SH da cisteína estão envolvidos na ligação dos metais. O aporte agudo (p. ex., por injeção) de cobre e de alguns outros metais aumenta a quantidade (indução) dessas proteínas nos tecidos, assim como a administração de determinados hormônios ou citocinas. Essas proteínas podem ter como função armazenar os metais citados anteriormente em forma atóxica e estão envolvidas no seu metabolismo global pelo organismo. O sequestro de cobre também diminui a quantidade deste metal disponível para formar radicais livres.

A doença de Menkes é causada por mutações do gene que codifica uma ATPase tipo P de ligação do cobre

A **doença de Menkes** (doença dos cabelos "enroscados" ou "encarapinhados") é um distúrbio do metabolismo do cobre. A doença está ligada ao X, acomete apenas lactentes do sexo masculino e afeta o sistema nervoso, o tecido conectivo e a vasculatura, sendo muitas vezes fatal na infância. O diagnóstico precoce é importante, já que a administração de injeções de cobre pode ser efetiva se a doença for tratada imediatamente. Em 1993, foi relatado que a base da doença de Menkes consistia em mutações do gene (o gene *ATP7A*) que codifica uma **ATPase tipo P de ligação do cobre** (a proteína ATP7A). Curiosamente, a enzima demonstrou ter semelhança estrutural com certas proteínas de ligação de metais de microrganismos. Acredita-se que essa ATPase seja responsável pela regulação do efluxo de cobre das células. Quando alterada por mutação, o cobre não é mobilizado normalmente do intestino, onde se acumula, bem como em uma série de outros tecidos e células, dos quais não consegue sair. Apesar do acúmulo de cobre, as atividades de muitas enzimas dependentes de cobre estão diminuídas, talvez em consequência de um defeito de sua incorporação nas apoenzimas. O fígado normal expressa uma quantidade muito pequena de ATPase, o que explica a ausência de comprometimento hepático na doença de Menkes. Essas pesquisas levaram à sugestão de que o fígado poderia conter uma ATPase de ligação do cobre diferente, que estaria envolvida na etiologia da doença de Wilson. Conforme descrito adiante, ficou comprovado que isso realmente ocorre.

A doença de Wilson também é causada por mutações de um gene que codifica uma ATPase tipo P de ligação do cobre

A **doença de Wilson** é uma doença genética, na qual o cobre não pode ser excretado na bile e, consequentemente, acumula-se no fígado, no cérebro, nos rins e nos eritrócitos. Essa doença pode ser considerada como uma incapacidade de manter um balanço de cobre de quase zero, resultando em **toxicose por cobre**. O aumento do cobre nos hepatócitos parece inibir o acoplamento desse metal à apoceruloplasmina, resultando em baixos níveis de ceruloplasmina no plasma. À medida que o cobre se acumula, os pacientes podem desenvolver anemia hemolítica, doença hepática crônica (cirrose e hepatite) e uma síndrome neurológica, devido ao acúmulo de cobre nos núcleos da base e em outros centros. Um achado clínico frequente é o **anel de Kayser-Fleischer**. Trata-se de um anel de pigmentação verde ou dourada em torno da córnea, devido ao depósito de cobre na membrana de Descemet. A **Tabela 50-7** fornece uma lista dos principais exames laboratoriais usados para avaliar o metabolismo do cobre. Se houver suspeita de doença de Wilson, deve-se efetuar uma **biópsia hepática**; o diagnóstico é estabelecido por um valor do cobre hepático superior a 250 μg/g de peso seco com níveis plasmáticos de ceruloplasmina inferiores a 20 mg/dL.

A etiologia da doença de Wilson também foi elucidada em 1993, quando foi relatado que diversas mutações de um gene que codifica uma **ATPase tipo P de ligação do cobre** (proteína ATP7B) eram responsáveis pelo distúrbio. O gene (*ATP7B*) supostamente codifica uma proteína de 1.411 aminoácidos, altamente homóloga ao produto do gene afetado na doença de Menkes. Por mecanismos ainda não totalmente explicados, uma ATPase não funcional provoca excreção deficiente de cobre na bile, redução da incorporação do metal na apoceruloplasmina e acúmulo de cobre no fígado e, posteriormente, em outros órgãos, como o cérebro.

O tratamento para a doença de Wilson consiste em alimentação com baixo teor de cobre com administração de **penicilamina** por toda a vida; esse fármaco liga-se ao cobre, é excretado na urina e, consequentemente, provoca depleção do excesso do mineral no corpo.

Outro distúrbio que envolve a ceruloplasmina é a **aceruloplasminemia**. Nessa doença genética, os níveis de ceruloplasmina estão muito baixos, e, consequentemente, a sua atividade de ferroxidase encontra-se acentuadamente reduzida. Isso leva a uma incapacidade de liberar o ferro das células, que se acumula em determinadas células cerebrais, nos hepatócitos e nas células das ilhotas pancreáticas. Os indivíduos acometidos apresentam **sinais neurológicos graves** e diabetes melito. O uso de um agente quelante ou a administração de plasma ou de concentrado de ceruloplasmina podem ser benéficos.

A deficiência genética de α_1-antiproteinase (α_1-antitripsina) está associada ao enfisema e a um tipo de doença hepática

A **α_1-antiproteinase** (com cerca de 52 kDa) era anteriormente denominada **α_1-antitripsina**, termo que será conservado neste capítulo. Trata-se de uma proteína de cadeia simples com 394 aminoácidos, que contém três cadeias oligossacarídicas. É o principal componente (> 90%) da fração α_1 do plasma humano. A α_1-antitripsina é sintetizada pelos hepatócitos e macrófagos e

TABELA 50-7 Principais exames laboratoriais na investigação das doenças do metabolismo do cobre

Exame	Valor de referência para adultos
Cobre sérico	10 a 22 μmol/L
Ceruloplasmina	200 a 600 mg/L
Cobre urinário	< 1 μmol/24 h
Cobre hepático	20 a 50 μg/g de peso seco

Fonte: Com base em Gaw A et al.: *Clinical Biochemistry.* Churchill Livingstone, 1995. Copyright © 1995 Elsevier Ltd. Reproduzida, com autorização, da Elsevier.

A. Elastase ativa + α_1–AT → Elastase inativa: complexo α_1–AT → Ausência de proteólise do pulmão → Ausência de lesão tecidual

B. Elastase ativa + ↓ ou nenhuma α_1–AT → Elastase ativa → Proteólise do pulmão → Lesão tecidual

FIGURA 50-11 Esquema ilustrando (A) a inativação normal da elastase pela α_1-antitripsina e (B) a situação em que a quantidade de α_1-antitripsina está consideravelmente reduzida, levando à proteólise pela elastase e lesão tecidual.

constitui o principal **inibidor das serino proteases** (**serpina** ou **Pi**), do plasma humano. A α_1-antitripsina inibe a tripsina, a elastase e algumas outras proteases ao formar complexos com essas enzimas. Existem pelo menos 75 **formas polimórficas**, muitas das quais podem ser separadas por eletroforese. O principal genótipo é MM, e o produto fenotípico é PiM. Existem duas áreas de interesse clínico no que concerne à α_1-antitripsina. A deficiência dessa proteína desempenha um papel em certos casos (aproximadamente 5%) de **enfisema**. Isso ocorre principalmente nos indivíduos com **genótipo ZZ**, que sintetizam PiZ, bem como nos heterozigotos PiSZ; nesses dois grupos, a quantidade de proteína secretada é consideravelmente menor nos indivíduos PiMM. Em comparação com PiM, as quantidades de proteína secretada são consideravelmente menores. Quando a quantidade de α_1-antitripsina é insuficiente, e os leucócitos polimorfonucleares acumulam-se nos pulmões (p. ex., durante uma pneumonia), o indivíduo acometido não dispõe de meios para impedir a lesão proteolítica do pulmão por proteases como a elastase (**Figura 50-11**). É muito interessante observar que uma **metionina** específica (resíduo 358) da α_1-antitripsina está envolvida em sua ligação às proteases. O **tabagismo** oxida essa metionina a sulfóxido de metionina e, portanto, a inativa. Em consequência, as moléculas alteradas de α_1-antitripsina não conseguem mais neutralizar as proteases. Isso é particularmente devastador em pacientes (p. ex., fenótipo PiZZ) que já apresentam baixos níveis de α_1-antitripsina. A redução adicional da α_1-antitripsina provocada pelo tabagismo resulta em maior destruição proteolítica do tecido pulmonar, acelerando o desenvolvimento do enfisema. A **administração intravenosa de α_1-antitripsina** (terapia de reforço) tem sido utilizada como medida adjuvante no tratamento de pacientes com enfisema associado à deficiência da α_1-antitripsina. Esforços estão sendo feitos, utilizando as técnicas de engenharia proteica, para substituir a metionina 358 por outro resíduo capaz de resistir à oxidação. A α_1-antitripsina "mutante" resultante ofereceria, assim, proteção contra as proteases por um período muito mais longo do que seria possível com a α_1-antitripsina nativa. Há também tentativas de desenvolver uma **terapia gênica** para essa doença. Uma abordagem consiste na utilização de um adenovírus modificado (um patógeno do trato respiratório) no qual o gene da α_1-antitripsina foi inserido. Em seguida, o vírus poderia ser introduzido no trato respiratório (p. ex., por aerossol). A esperança é de que as células do epitélio pulmonar expressem o gene e secretem localmente a α_1-antitripsina. Experimentos realizados em animais indicaram a viabilidade dessa abordagem.

A deficiência de α_1-antitripsina também foi implicada em um tipo de **doença hepática** (doença hepática com deficiência de α_1-antitripsina). Nesse distúrbio, ocorre acúmulo de moléculas do **fenótipo ZZ**, que se agregam nas cisternas do retículo endoplasmático dos hepatócitos. A agregação é causada pela formação de **polímeros** de α_1-antitripsina mutante, que se formam por uma forte interação entre uma alça específica de uma molécula e uma folha β-pregueada proeminente de outra molécula (polimerização alça-lâmina). Por mecanismos ainda não elucidados, ocorre **hepatite** com consequente **cirrose** (acúmulo de quantidades maciças de colágeno, resultando em fibrose). É possível que a administração de um peptídeo sintético semelhante à sequência da alça possa inibir essa polimerização alça-folha. As doenças como a deficiência de α_1-antitripsina, cuja patologia celular é causada principalmente pela presença de agregados de formas anormais de proteínas específicas, foram denominadas **doenças conformacionais** (ver também Capítulo 46). A maioria parece ser causada pela formação de folhas β por proteínas de conformação instável, determinando, por sua vez, a formação de agregados. Outros membros desse grupo de distúrbios incluem a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson e a doença de Huntington.

Atualmente, a doença hepática grave por deficiência da α_1-antitripsina pode ser tratada com sucesso por **transplante de fígado**. Futuramente, a introdução do gene da α_1-antitripsina normal nos hepatócitos poderá ser possível, mas isso não deverá interromper a produção da proteína PiZ. A **Figura 50-12** mostra um esquema da etiologia dessa doença.

A α_2-macroglobulina neutraliza muitas proteases e direciona determinadas citocinas para os tecidos

A **α_2-macroglobulina** é uma glicoproteína plasmática grande (720 kDa), constituída por quatro subunidades idênticas de 180 kDa. Responde por 8 a 10% das proteínas plasmáticas totais nos seres humanos. Cerca de 10% do **zinco** no plasma são transportados pela α_2-macroglobulina, enquanto o restante é transportado pela albumina. A proteína é sintetizada por vários tipos de células, in-

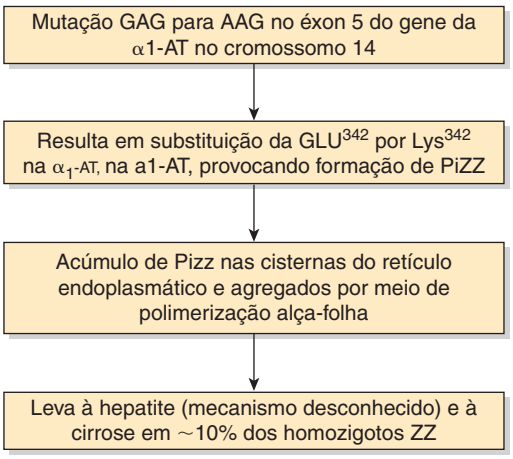


FIGURA 50-12 Esquema para a etiologia da doença hepática por deficiência de α_1-antitripsina. A mutação mostrada provoca formação de PiZZ (OMIM 107400). (α_1-AT, α_1-antitripsina.)

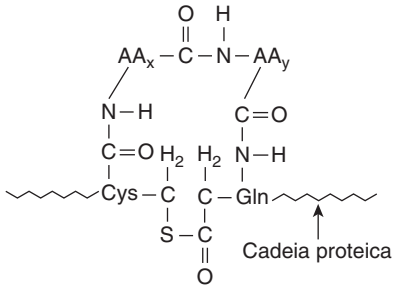


FIGURA 50-13 Uma ligação tiol éster cíclica interna, como aquela encontrada na α_2-macroglobulina. AA_x e AA_y são aminoácidos adjacentes à cisteína e à glutamina.

TABELA 50-8 Uma classificação da amiloidose

Tipo	Proteína implicada
Primária	Principalmente cadeias leves de imunoglobulinas
Secundária	Amiloide A sérico (SAA)
Familiar	Transtirretina; raramente também apolipoproteína A-1, cistatina C, fibrinogênio, gelsolina, lisozima
Doença de Alzheimer	Peptídeo β amiloide (ver Capítulo 57, caso nº 2)
Relacionada com diálise	β_2-microglobulina

Nota: Outras proteínas além das listadas também foram implicadas na amiloidose.

cluindo monócitos, hepatócitos e astrócitos. Trata-se do principal membro de um grupo de proteínas plasmáticas que incluem as proteínas C3 e C4 do complemento. Essas proteínas contêm uma **ligação tiol éster cíclica interna** (formada entre um resíduo de cisteína e outro de glutamina, ver **Figura 50-13**) singular e, por esse motivo, foram designadas como **família de proteínas plasmáticas tiol éster**. Essa ligação é altamente reativa e está envolvida em algumas das ações biológicas da α_2-macroglobulina.

A α_2-macroglobulina liga-se a muitas proteinases e, portanto, constitui um importante **pan-inibidor de proteinases**. Os complexos de α_2-macroglobulina-proteinase são rapidamente depurados do plasma por um receptor localizado em numerosos tipos de células. Além disso, a α_2-macroglobulina liga-se a muitas **citocinas** (fator de crescimento derivado das plaquetas, fator de transformação do crescimento β, etc.) e parece estar envolvida no direcionamento dessas citocinas para determinados tecidos ou células. Quando captadas por células, as citocinas podem dissociar-se da α_2-macroglobulina e exercer, depois, vários efeitos sobre o crescimento e a função celulares. A ligação das proteinases e das citocinas à α_2-macroglobulina envolve mecanismos diferentes, os quais não serão considerados neste capítulo.

A amiloidose ocorre devido ao depósito de proteínas ou de fragmentos proteicos em vários tecidos

A **amiloidose** é o acúmulo de várias proteínas fibrilares insolúveis entre as células dos tecidos, a ponto de afetar a sua função. Em geral, o acúmulo deve-se à **produção aumentada** de determinadas proteínas, ou ao **acúmulo de formas mutantes** de outras proteínas (ver adiante). A doença pode acometer um ou mais órgãos ou tecidos, e o quadro clínico depende dos locais e da extensão de depósito das fibrilas amiloides. Em geral, as fibrilas representam fragmentos proteolíticos de várias proteínas plasmáticas e possuem uma **estrutura em folha β-pregueada**. O termo "amiloidose" é uma designação incorreta, pois se pensava originalmente que as fibrilas fossem semelhantes ao amido na natureza.

Atualmente, a amiloidose é muitas vezes classificada como AX, em que A representa amiloidose, e X, a proteína nas fibrilas. Todavia, esse sistema não será utilizado aqui. A **Tabela 50-8** fornece uma **classificação** simples da amiloidose. A amiloidose **primária** é geralmente causada por um distúrbio de plasmócitos monoclonais, em que a proteína que se acumula é um fragmento de uma **cadeia leve** (ver adiante) de uma imunoglobulina. A amiloidose **secundária** surge normalmente em consequência de infecções crônicas ou câncer e deve-se ao acúmulo de produtos de degradação do **amiloide A sérico** (SAA). Ocorre síntese aumentada de SAA nos estados inflamatórios crônicos, devido aos níveis elevados de certas citocinas inflamatórias que estimulam o fígado a produzir maiores quantidades dessa proteína. A amiloidose **familiar** resulta do acúmulo de formas mutantes de determinadas proteínas plasmáticas, particularmente a **transtirretina** (ver Tabela 50-2). Foram documentadas mais de 80 formas mutantes dessa proteína. Outras proteínas plasmáticas também podem acumular-se em outros tipos raros de amiloidose familiar. Em pacientes submetidos à diálise crônica de longo prazo, pode ocorrer acúmulo da proteína plasmática **β_2-microglobulina**, já que ela é retida no plasma pelas membranas de diálise. Acredita-se que o acúmulo de uma proteína de tipo amiloide seja um fator crucial na etiologia da doença de Alzheimer (ver Caso 2, Capítulo 57). Em todos os casos, pelo menos 20 proteínas diferentes foram implicadas nos vários tipos de amiloidose. Os fatores precisos que determinam o depósito de fragmentos proteolíticos nos tecidos ainda não foram elucidados. Em geral, as fibrilas amiloides têm um **componente P** associado que deriva do **componente P do amiloide sérico**, proteína plasmática estreitamente relacionada com a proteína C reativa. Os cortes histológicos contendo fibrilas amiloides interagem com o **corante vermelho Congo** e emitem uma intensa birrefringência esverdeada quando examinados à microscopia de luz polarizada. O depósito de amiloide ocorre em pacientes com uma variedade de distúrbios; deve-se instituir o **tratamento do distúrbio subjacente**, se possível.

Em geral, as abordagens experimentais ao tratamento da amiloidose podem ser consideradas em três categorias: (1) prevenção da produção da proteína precursora; (2) estabilização das estruturas das proteínas precursoras, de modo que não sejam convertidas em estruturas de folha β-pregueada, e (3) desestabilização das fibrilas amiloides, para que sejam reconvertidas em suas conformações normais. Por exemplo, no que concerne à terceira abordagem, vários **ligantes pequenos** ligam-se com alta afinidade às fibrilas amiloides. Por exemplo, a **antraciclina iodada** liga-se especificamente e com alta afinidade a todas as fibrilas amiloides naturais e promove a sua desagregação *in vitro*. Outra abordagem semelhante foi o desenvolvimento do fármaco

eprodisato. As fibrilas amiloides ligam-se aos glicosaminoglicanos (ver Capítulo 48) nos tecidos. O eprodisato liga-se aos GAGs e, assim, rompe a ligação das fibrilas a essas moléculas. Espera-se que moléculas que afetam qualquer um dos três processos mencionados possam ser úteis no tratamento da amiloidose.

AS IMUNOGLOBULINAS PLASMÁTICAS DESEMPENHAM UM IMPORTANTE PAPEL NOS MECANISMOS DE DEFESA DO CORPO

O sistema imune do organismo consiste em três componentes principais: os **linfócitos B**, os **linfócitos T** e o **sistema imune inato**. Os linfócitos B originam-se principalmente de células da medula óssea nos animais superiores e da bolsa de Fabricius nas aves. Os linfócitos T originam-se do timo. As **células B** são responsáveis pela síntese dos anticorpos humorais circulantes, também conhecidos como **imunoglobulinas**. As **células T** estão envolvidas em uma série de **processos imunológicos celulares** importantes, como a rejeição de enxertos, reações de hipersensibilidade e defesa contra células malignas e muitos vírus. O **sistema imune inato** defende o organismo contra infecções de modo inespecífico e, diferentemente das células B e T, **não é adaptativo**. Contém várias células, como fagócitos, neutrófilos, células *natural killer* e outras células. O caso número 1 do Capítulo 57 descreve uma condição na qual existe uma deficiência genética de células T, devido a uma mutação no gene que codifica a adenosina desaminase. Existem várias outras condições nas quais **diversos componentes do sistema imune estão deficientes em consequência de mutações**. A maioria caracteriza-se por **infecções recorrentes**, as quais precisam ser tratadas de modo vigoroso com a administração, por exemplo, de imunoglobulinas (se estiverem deficientes) e antibióticos apropriados.

Esta seção analisa apenas as imunoglobulinas plasmáticas, que são sintetizadas principalmente pelos **plasmócitos**. Os plasmócitos são células especializadas da linhagem de células B, que sintetizam e secretam imunoglobulinas no plasma em resposta à exposição a uma variedade de antígenos.

Todas as imunoglobulinas contêm, no mínimo, duas cadeias leves e duas cadeias pesadas

As **imunoglobulinas** contêm, no mínimo, duas cadeias leves (L) (23 kDa) e duas cadeias pesadas (H) (53 a 75 kDa) idênticas, reunidas na forma de um tetrâmero (L_2H_2) por pontes dissulfeto. A estrutura da IgG está ilustrada na **Figura 50-14**; essa imunoglobulina apresenta uma **forma em Y**, e a ligação do antígeno ocorre em ambas as pontas do Y. Cada cadeia pode ser dividida conceitualmente em domínios específicos, ou regiões, que possuem significado estrutural e funcional. A metade da cadeia leve (L) voltada para a extremidade carboxiterminal é designada como **região constante** ($\mathbf{C_L}$), enquanto a metade aminoterminal é a **região variável** da cadeia leve (V_L). Aproximadamente 25% da cadeia pesada (H) nas extremidades aminoterminais são designados como **região variável** (V_H), enquanto os 75% restantes da cadeia pesada são conhecidos como **regiões constantes** ($\mathbf{C_H1}$, $\mathbf{C_H2}$, $\mathbf{C_H3}$) dessa cadeia H. A porção da molécula de imunoglobulina que se liga ao antígeno específico é formada pelas porções aminoterminais (regiões variáveis) das cadeias H e L – isto é, os domínios V_H e V_L. Os domínios das cadeias proteicas consistem

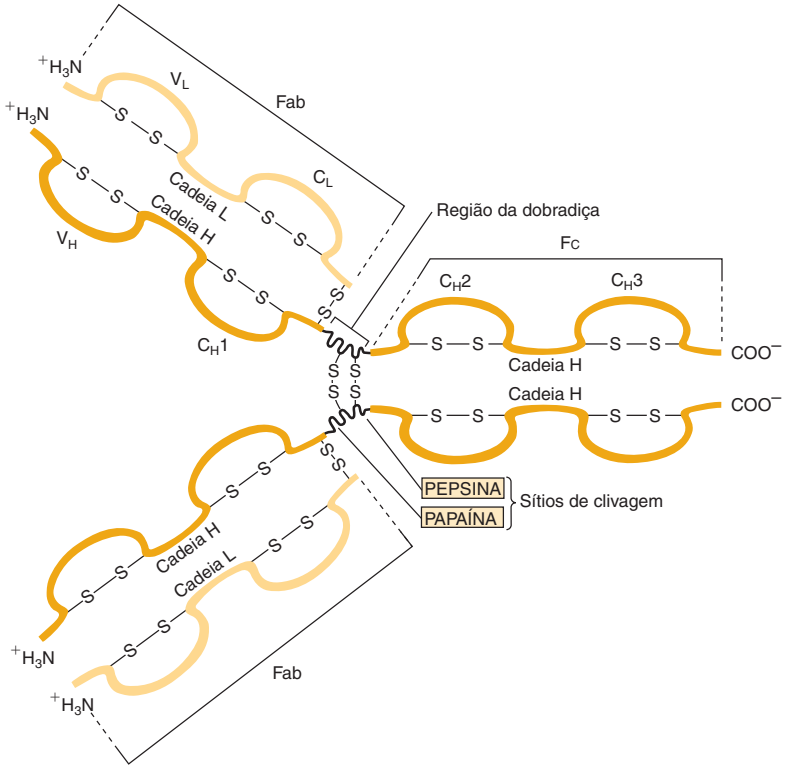


FIGURA 50-14 Estrutura da IgG. A molécula consiste em duas cadeias leves (L) e duas cadeias pesadas (H). Cada cadeia leve consiste em uma região variável (V_L) e em uma região constante (C_L). Cada cadeia pesada consiste em uma região variável (V_H) e outra constante, dividida em três domínios (C_H1, C_H2 e C_H3). O domínio C_H2 contém o sítio de ligação do complemento, enquanto o domínio C_H3 apresenta um sítio que se liga aos receptores existentes nos neutrófilos e macrófagos. O sítio de ligação do antígeno é formado pelas regiões hipervariáveis de ambas as cadeias leve e pesada, localizadas nas regiões variáveis dessas cadeias (ver Figura 50-10). As cadeias leve e pesada estão ligadas por pontes dissulfeto, e as cadeias pesadas também estão ligadas entre si por pontes dissulfeto. (Reproduzida, com autorização, de Parslow TG et al. (editors): *Medical Immunology,* 10th ed. McGraw-Hill, 2001.)

em duas lâminas de segmentos antiparalelos distintos de aminoácidos que se ligam ao antígeno.

Conforme ilustrado na Figura 50-14, a digestão de uma imunoglobulina pela enzima **papaína** produz dois fragmentos de ligação do antígeno (**Fab**) e um fragmento cristalizável (**Fc**), que é responsável por outras funções das imunoglobulinas, além da ligação direta aos antígenos. Como existem duas regiões Fab, as moléculas de IgG ligam-se a duas moléculas de antígeno e são denominadas **divalentes.** O sítio do antígeno ao qual o anticorpo se liga é denominado **determinante antigênico** ou **epítopo**. A área na qual a papaína cliva a molécula de imunoglobulina – isto é, a região entre os domínios C_H1 e C_H2 – é designada como "**região da dobradiça**". A região da dobradiça confere **flexibilidade** e possibilita o movimento independente de ambos os braços Fab, facilitando, assim, a sua ligação aos sítios antigênicos que podem estar a distâncias variáveis (p. ex., nas superfícies das bactérias). As regiões Fc e da dobradiça diferem nas diferentes classes de anticorpos, porém o modelo global da estrutura de um anticorpo para cada classe assemelha-se ao ilustrado na Figura 50-14 para a IgG.

Todas as cadeias leves são do tipo kappa ou lambda

Existem dois tipos gerais de cadeias leves, **kappa** (**κ**) e **lambda** (**λ**), que podem ser distinguidos com base em diferenças estruturais observadas em suas regiões C_L. Uma determinada molécula de imunoglobulina sempre contém duas cadeias leves κ ou duas cadeias leves λ – nunca uma mistura de κ e λ. Nos seres humanos, as cadeias κ são mais frequentes do que as cadeias λ nas moléculas de imunoglobulinas.

Os cinco tipos de cadeia pesada determinam a classe da imunoglobulina

Nos seres humanos, foram identificadas **cinco classes** de cadeias H (**Tabela 50-9**) que são distinguidas com base em diferenças nas suas **regiões C_H**. Essas classes são designadas como λ, α, μ, δ, e ε. As cadeias μ e ε têm quatro domínios C_H, em lugar dos três habituais. O tipo de cadeia H determina a classe de imunoglobulina e, portanto, a sua função efetora. Por conseguinte, existem cinco classes de imunoglobulinas: **IgG**, **IgA**, **IgM**, **IgD** e **IgE**. A **Tabela 50-10** fornece um resumo das funções biológicas dessas cinco classes.

Não existem duas regiões variáveis idênticas

As **regiões variáveis** das moléculas de imunoglobulinas consistem nos domínios V_L e V_H e são muito heterogêneas. Na verdade, não foram identificadas duas regiões variáveis de diferentes indivíduos com sequências idênticas de aminoácidos. Entretanto, as análises dos aminoácidos demonstraram que as regiões variáveis são constituídas de **regiões relativamente invariáveis** e outras **regiões hipervariáveis** (**Figura 50-15**). As cadeias L possuem três regiões hipervariáveis (em V_L), enquanto as cadeias H têm quatro (em V_H). Essas **regiões hipervariáveis** formam o **sítio de ligação dos antígenos** (localizado nas extremidades do Y ilustrado na Figura 50-14) e determinam a notável especificidade dos anticorpos. Por esse motivo, as regiões hipervariáveis são também conhecidas como **regiões de determinação da complementaridade** (**CDR**). Cerca de cinco a 10 aminoácidos em cada região hipervariável (CDR) contribuem para o sítio de ligação

TABELA 50-9 Propriedades das imunoglobulinas humanas

Propriedade	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Porcentagem das imunoglobulinas totais no soro (aproximada)	75	15	9	0,2	0,004
Concentração sérica (mg/dL) (aproximada)	1.000	200	120	3	0,05
Coeficiente de sedimentação	7S	7S ou 11S[1]	19S	7S	8S
Peso molecular (× 1.000)	150	170 ou 400[1]	900	180	190
Estrutura	Monômero	Monômero ou dímero	Monômero ou pentâmero	Monômero	Monômero
Símbolo da cadeia H	γ	α	μ	δ	ε
Fixação do complemento	+	–	+	–	–
Transferência placentária	+	–	–	?	–
Mediação das respostas alérgicas	–	–	–	–	+
Presente em secreções	–	+	–	–	–
Opsonização	+		–[2]	–	–
Receptor de antígenos na célula B	–	–	+	?	–
A forma polimérica contém cadeia J	–	+	+	–	–

Fonte: Reproduzida, com autorização, de Levinson W, Jawetz E: *Medical Microbiology and Immunology,* 7th ed. McGraw-Hill, 2002.
[1]A forma 11S é encontrada em secreções (p. ex., saliva, leite e lágrimas) e nos líquidos dos tratos respiratório, intestinal e genital.
[2]A IgM opsoniza indiretamente pela ativação do complemento, produzindo C3b, que é uma opsonina.

TABELA 50-10 Principais funções das imunoglobulinas

Imunoglobulina	Principais funções
IgG	Principal anticorpo na resposta secundária. Opsoniza as bactérias e facilita a sua fagocitose. Fixa o complemento, potencializando a destruição das bactérias. Neutraliza as toxinas bacterianas e os vírus. Atravessa a placenta.
IgA	A IgA secretora impede a fixação das bactérias e dos vírus às mucosas. Não fixa o complemento.
IgM	Produzida na resposta primária a um antígeno. Fixa o complemento. Não atravessa a placenta. Receptor de antígeno na superfície das células B.
IgD	Encontrada na superfície das células B, onde atua como receptor de antígeno.
IgE	Medeia a hipersensibilidade imediata ao provocar a liberação de mediadores dos mastócitos e basófilos após exposição ao antígeno (alérgeno). Defende contra infecções por helmintos, provocando a liberação de enzimas dos eosinófilos. Não fixa o complemento. Principal defesa do hospedeiro contra infecções helmínticas.

Fonte: Reproduzida, com autorização, de Levinson W, Jawetz E: *Medical Microbiology and Immunology,* 7th ed. McGraw-Hill, 2002.

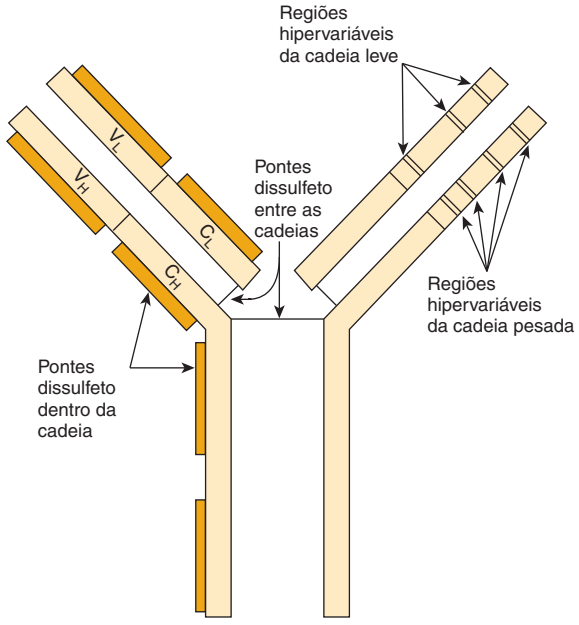


FIGURA 50-15 Modelo esquemático de uma molécula de IgG, mostrando as posições aproximadas das regiões hipervariáveis nas cadeias pesada e leve. O sítio de ligação do antígeno é formado por essas regiões hipervariáveis. As regiões hipervariáveis são também denominadas regiões determinantes da complementaridade (CDR). (Modificada e reproduzida, com autorização, de Parslow TG et al. (editors): *Medical Immunology,* 10th ed. McGraw-Hill, 2001.)

dos antígenos. As CDR localizam-se em pequenas alças dos domínios variáveis, e as regiões polipeptídicas circundantes entre as regiões hipervariáveis são conhecidas como **regiões estruturais**. As CDR dos domínios V_H e V_L, reunidas pelo dobramento das cadeias polipeptídicas nas quais estão contidas, formam uma única superfície hipervariável que constitui o **sítio de ligação do antígeno**. Várias combinações de CDR das cadeias H e L podem dar origem à numerosos anticorpos de especificidades diferentes, o que contribui para a enorme diversidade das moléculas de anticorpos, processo denominado **diversidade combinatória**. Os antígenos grandes interagem com todas as CDR de um anticorpo, enquanto os ligantes pequenos podem interagir com apenas uma ou algumas CDR que formam uma bolsa ou cavidade na molécula do anticorpo. A essência das interações antígeno-anticorpo é a **complementaridade mútua** entre as superfícies das CDR e os epítopos. As interações entre os anticorpos e os antígenos dependem de **forças e ligações não covalentes** (forças eletrostáticas e de van der Waals, bem como pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas).

As regiões constantes determinam as funções efetoras específicas de cada classe

As **regiões constantes** das moléculas de imunoglobulinas, particularmente a C_H2 e a C_H3 (e a C_H4 da IgM e IgE), que constituem o fragmento Fc, são responsáveis pelas **funções efetoras específicas de cada classe** das diferentes moléculas de imunoglobulina (Tabela 50-9, parte inferior), como, por exemplo, a fixação do complemento ou a passagem transplacentária.

Algumas imunoglobulinas, como a IgG imune, só existem na estrutura tetramérica básica, enquanto outras, como a IgA e a IgM, podem ser encontradas em polímeros de maior ordem de duas, três (IgA) ou cinco (IgM) unidades tetraméricas (**Figura 50-16**).

As cadeias L e H são sintetizadas como moléculas separadas e sofrem montagem subsequente dentro da célula B ou do plasmócito, formando moléculas maduras de imunoglobulinas, que são **glicoproteínas**.

Tanto as cadeias leves quanto as cadeias pesadas são produtos de múltiplos genes

Cada **cadeia leve** de imunoglobulina é o produto de pelo menos três genes estruturais distintos: um gene para a **região variável** (V_L), um gene para a **região de junção** (*J*) (que não tem nenhuma relação com a cadeia J da IgA ou da IgM) e um gene para a **região constante** (C_L). Cada **cadeia pesada** é o produto de pelo menos **quatro** genes diferentes: um gene para a **região variável** (V_H), um gene para a **região de diversidade** (*D*), um gene para a **região de junção** (*J*) e um gene para a **região constante** (C_H). Portanto, o conceito de "um gene, uma proteína" não é válido neste caso. Os mecanismos moleculares responsáveis pela formação das cadeias de imunoglobulinas a partir de múltiplos genes estruturais são discutidos nos Capítulos 35 e 38.

A diversidade dos anticorpos depende dos rearranjos gênicos

Cada indivíduo é capaz de produzir anticorpos dirigidos contra talvez 1 milhão de antígenos diferentes. A geração dessa imensa **diversidade de anticorpos** depende de vários fatores, como a

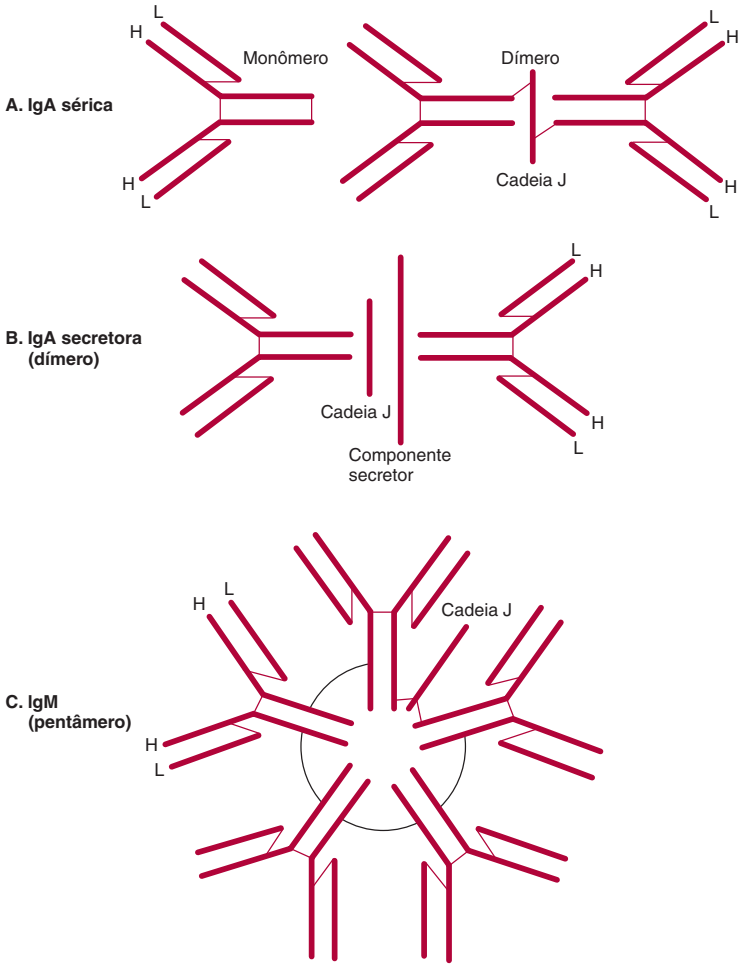


FIGURA 50-16 Representação esquemática da IgA sérica, IgA secretora e IgM. Tanto a IgA quanto a IgM apresentam uma cadeia J, porém apenas a IgA secretora tem um componente secretor. As cadeias polipeptídicas são representadas por linhas grossas; as pontes dissulfeto entre diferentes cadeias polipeptídicas são representadas por linhas finas. (Reproduzida, com autorização, de Parslow TG et al. (editors): *Medical Immunology,* 10th ed. McGraw-Hill, 2001.)

existência de múltiplos segmentos de genes (segmentos V, C, J e D), suas recombinações (ver Capítulos 35 e 38), as combinações de diferentes cadeias L e H, a alta frequência de mutações somáticas nos genes das imunoglobulinas e a **diversidade juncional**. Esta última reflete a adição ou a deleção de uma quantidade aleatória de nucleotídeos, quando determinados segmentos de genes são reunidos, introduzindo um grau adicional de diversidade. Assim, os fatores citados anteriormente asseguram a possibilidade de síntese de um **grande número de anticorpos** a partir de várias centenas de segmentos de genes.

A mudança de classe (isotipo) ocorre durante as respostas imunes

Na maioria das respostas imunes humorais, os anticorpos com especificidade idêntica, porém de classes diferentes, são produzidos segundo uma ordem cronológica específica em resposta ao imunógeno (antígeno imunizante). Por exemplo, os anticorpos da classe IgM normalmente precedem as moléculas da classe IgG. A mudança de uma classe para outra é designada como "**mudança de classe ou isotipo**", e a sua base molecular tem sido extensamente investigada. Um único tipo de cadeia leve de imunoglobulina pode combinar-se com uma cadeia μ específica do antígeno para produzir uma molécula de IgM específica. Posteriormente, a mesma cadeia leve específica do antígeno combina-se com uma cadeia γ com uma região V_H idêntica para produzir uma molécula de IgG com especificidade antigênica idêntica à da molécula original de IgM. A mesma cadeia leve também pode combinar-se com uma cadeia pesada α, que também contém a região V_H idêntica, formando uma molécula de IgA com especificidade antigênica idêntica. Essas três classes de moléculas de imunoglobulinas (IgM, IgG e IgA) dirigidas contra o mesmo antígeno possuem **domínios variáveis idênticos** em ambas as cadeias leves (V_L) e pesadas (V_H), e diz-se que elas compartilham um **idiotipo**. (Os idiotipos são determinantes antigênicos formados pelos aminoácidos específicos das regiões hipervariáveis.) Consequentemente, as **diferentes classes** dessas três imunoglobulinas (denominadas **isotipos**) são determinadas por suas regiões **C_H diferentes**, que estão combinadas com as mesmas regiões V_H específicas do antígeno.

A produção excessiva ou insuficiente de imunoglobulinas pode resultar em doenças

Entre os distúrbios das imunoglobulinas, destaca-se a **produção aumentada** de classes específicas ou até mesmo de moléculas específicas de imunoglobulinas, sendo estas últimas produzidas por tumores clonais de plasmócitos, denominados mielomas. O **mieloma múltiplo** é uma doença neoplásica; a eletroforese do soro ou da urina geralmente revela um acentuado aumento de

determinada imunoglobulina ou de uma cadeia leve específica (esta última conhecida como proteína de Bence-Jones). A **produção diminuída** pode limitar-se a uma única classe de moléculas de imunoglobulinas (p. ex., IgA ou IgG) ou pode incluir a produção deficiente de todas as classes de imunoglobulinas (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM). Uma grave redução da síntese de uma classe de imunoglobulina em consequência de uma anormalidade genética pode levar a uma doença grave por imunodeficiência – por exemplo, **agamaglobulinemia**, em que a produção de IgG está acentuadamente afetada –, em virtude do comprometimento das defesas do hospedeiro contra microrganismos.

Os hibridomas constituem pontes de longo prazo de anticorpos monoclonais de grande utilidade

Quando se injeta um antígeno em um animal, os anticorpos resultantes são **policlonais**, isto é, são sintetizados por uma mistura de células B. Os anticorpos policlonais são dirigidos contra vários sítios diferentes (epítopos ou determinantes) do antígeno e, portanto, **não são monoespecíficos**. Entretanto, com um método desenvolvido por Kohler e Milstein, é possível obter quantidades quase ilimitadas de um único anticorpo monoclonal específico contra um epítopo.

Esse método consiste em **fusão celular**, e a linhagem celular permanente que resulta é denominada **hibridoma**. Geralmente, são obtidas células B do baço de um camundongo (ou de outro animal apropriado) no qual se injetou previamente um antígeno ou uma mistura de antígenos (p. ex., células estranhas). As células B são misturadas com **células do mieloma** do camundongo e expostas ao polietilenoglicol, que provoca fusão celular. A **Figura 50-17** fornece um resumo dos princípios envolvidos na produção de células do hibridoma. Sob as condições utilizadas, apenas as células do hibridoma multiplicam-se em cultura de células. Isso requer a semeadura das células híbridas em meio contendo hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), em uma concentração em que cada placa contém aproximadamente uma célula. Então, um **clone** de células do hibridoma multiplica-se em cada placa. O meio de cultura é recuperado e avaliado quanto à presença de anticorpos que reagem com o antígeno ou antígenos originais. Se o imunógeno for uma mistura de muitos antígenos (p. ex., uma preparação de membrana celular), a placa de cultura irá apresentar um clone de células do hibridoma que irão sintetizar o anticorpo monoclonal contra um determinante antigênico específico da mistura. Com a recuperação dos meios de muitas placas de cultura, pode-se obter uma bateria de anticorpos monoclonais, muitos dos quais são específicos para componentes individuais da mistura imunogênica. As células do hibridoma podem ser congeladas e armazenadas e, mais tarde, descongeladas quando houver necessidade de mais anticorpos, assegurando, assim, um suprimento de longo prazo. As células do hibridoma também podem ser cultivadas no abdome de camundongos, proporcionando suprimentos relativamente grandes de anticorpos. Esforços estão sendo feitos para produzir anticorpos monoclonais **humanos**.

Em virtude de sua **especificidade**, os anticorpos monoclonais tornaram-se **reagentes** extremamente **úteis** em muitas áreas da biologia e da medicina. Por exemplo, são utilizados para medir as quantidades de muitas proteínas específicas (p. ex., proteínas plasmáticas), esclarecer a natureza dos agentes infecciosos (p. ex., tipos de bactérias) e subclassificar as células normais (p. ex., linfócitos) e tumorais (p. ex., células leucêmicas). Além disso, os anticorpos monoclonais estão sendo usados para direcionar agentes terapêuticos para células tumorais, bem como para acelerar a eliminação de fármacos da circulação quando alcançam níveis tóxicos (p. ex., digoxina).

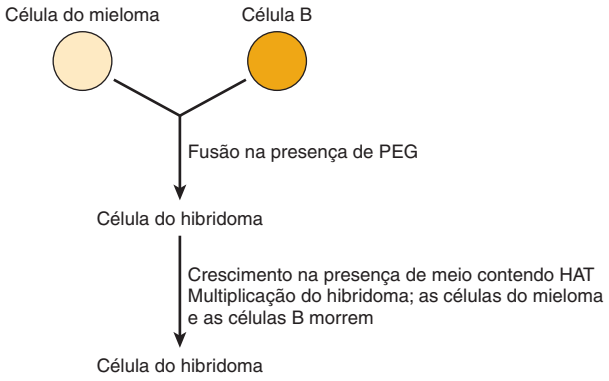


FIGURA 50-17 Esquema de produção de uma célula de hibridoma. As células do mieloma são imortalizadas, não produzem anticorpos e são $HGPRT^-$ (tornando a via de recuperação da síntese de purinas [ver Capítulo 33] inativa). As células B não são imortalizadas, cada uma produz um anticorpo específico, e elas são $HGPRT^+$. O polietilenoglicol (PEG) estimula a fusão celular. As células do hibridoma resultante são imortalizadas (pelas células do mieloma precursor), produzem anticorpos e são $HGPRT^+$ (essas últimas duas propriedades são adquiridas das células B originais). As células B morrem no meio de cultura, pois não foram imortalizadas. Na presença de HAT, as células do mieloma também irão morrer, visto que a aminopterina no meio contendo HAT suprime a síntese de purinas pela via *de novo* ao inibir a reutilização do tetra-hidrofolato (ver Capítulo 33). Todavia, as células do hibridoma sobrevivem, proliferam (visto que são $HGPRT^+$) e – se forem clonadas – produzem anticorpo monoclonal. (HAT, hipoxantina, aminopterina e timidina; HGPRT, hipoxantina-guanina-fosforribosil transferase.)

Para **uso terapêutico nos seres humanos**, os anticorpos monoclonais produzidos em camundongos podem ser **humanizados**. Esse processo pode ser efetuado pela fixação das CDR (os sítios que se ligam a antígenos) a sítios apropriados de uma molécula de imunoglobulina humana. Isso produz um anticorpo muito semelhante ao anticorpo humano, **reduzindo** acentuadamente a **imunogenicidade** e as probabilidades de uma reação anafiláctica.

O sistema complemento é constituído por cerca de 20 proteínas plasmáticas e está envolvido na lise celular, na inflamação e em outros processos

O plasma contém aproximadamente 20 proteínas que são membros do **sistema complemento**. Esse sistema foi descoberto quando se observou que a adição de soro fresco contendo anticorpos dirigidos contra uma bactéria provocava a sua **lise**. Diferentemente dos anticorpos, o fator era **lábil** quando aquecido a 56°C.

Pesquisas adicionais identificaram as proteínas do sistema e estabeleceram o seu funcionamento; a maioria foi clonada e sequenciada. O sistema complemento está envolvido na capacidade de **lisar** diversas células, mas também em determinados aspectos da **inflamação** (p. ex., quimiotaxia e fagocitose) e na **depuração de complexos antígeno-anticorpo** da circulação. As deficiências de vários componentes do sistema devido a mutações provocam **distúrbios de deficiência do complemento**. Os detalhes desse sistema são relativamente complexos, e o leitor deve consultar um livro de imunologia. O conceito básico é de que as **proteínas normalmente inativas** do sistema, quando estimuladas por diversos estímulos, tornam-se **ativadas por proteólise** e interagem, em uma sequência específica, com uma ou mais das outras proteínas do sistema. **O resultado global da ativação da via consiste em lise celular** e na geração de **fragmentos peptídicos ou polipeptídicos**, que estão envolvidos em vários aspectos da inflamação. O sistema complemento assemelha-se à coagulação sanguínea (Capítulo 51), visto que envolve a **conversão de precursores inativos em produtos ativos por proteases** e **uma cascata de amplificação**.

RESUMO

- O plasma contém muitas proteínas com múltiplas funções. A maioria é sintetizada no fígado e glicosilada.
- A albumina, que não é glicosilada, constitui a principal proteína e o principal determinante da pressão osmótica intravascular. Além disso, liga-se a muitos ligantes, como fármacos e bilirrubina.
- A haptoglobina liga-se à hemoglobina extracorpuscular, impede a sua eliminação nos rins e na urina e, portanto, conserva o ferro para sua reutilização.
- A transferrina liga-se ao ferro e o transporta até os locais onde ele é necessário. A ferritina é responsável pelo armazenamento intracelular do ferro. A regulação dos níveis corporais de ferro envolve uma bateria de proteínas, algumas das quais – como a ferroportina e a hepcidina – só foram descobertas há relativamente pouco tempo. A anemia ferropriva é um distúrbio muito prevalente. A hemocromatose hereditária, doença genética que envolve a absorção excessiva de ferro, é discutida no Capítulo 57 (Caso 10). Existem vários exames laboratoriais para avaliar o estado do ferro (p. ex., excesso ou deficiência) no corpo humano, e muitas proteínas diferentes estão envolvidas em diferentes aspectos de seu metabolismo.
- A ceruloplasmina contém quantidades substanciais de cobre, porém a albumina parece ser mais importante para o seu transporte. Foi constatado que tanto a doença de Wilson quanto a doença de Menkes, que refletem anormalidades do metabolismo do cobre, são causadas por mutações dos genes que codificam ATPases tipo P de ligação do cobre.
- A α_1-antitripsina é o principal inibidor das serino proteases do plasma, inibindo, em particular, a elastase dos neutrófilos. A deficiência genética dessa proteína constitui uma causa de enfisema e também pode resultar em doença hepática.
- A α_2-macroglobulina é uma proteína plasmática importante, que neutraliza muitas proteases e direciona determinadas citocinas para órgãos específicos.
- As imunoglobulinas desempenham um papel essencial nos mecanismos de defesa do organismo, assim como as proteínas do sistema complemento. Este capítulo descreve de modo sucinto algumas das principais características dessas proteínas.

REFERÊNCIAS

Andrew NC: Forging a field: the golden age of iron biology. Blood 2008;112:219.

Burtis CA, Ashwood EA, Bruns DE (editors): *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics,* 4th ed. Elsevier Saunders, 2006. (Chapters 20, 26, and 31 give extensive coverage of plasma proteins, complement proteins, immunoglobulins, C-reactive protein, hemoglobin, iron, and bilirubin).

Craig WY, Ledue TB, Ritchie RF: *Plasma Proteins: Clinical Utility and Interpretation.* Foundation for Blood Research, 2008.

Fauci AS, Branwald E, Kasper DL, et al: *Harrison's Principles of Internal Medicine,* 17th ed. McGraw-Hill, 2008 (Chapters 58, 98, and 308 contain coverage of anemia and polycythemia, iron deficiency and other hypoproliferative anemias, and an introduction to the immune system).

Ganz T: Iron homeostasis: fitting the puzzle pieces together. Cell Metab 2008;7:288.

Hentz MW, Muckenthaler MU, Gali B, et al: Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. Cell 2010;142:24.

Lab Tests Online: http://www.labtestsonline.org/ (A comprehensive web site provided by the American Association of Clinical Chemists that provides information on the measurement and significance of the various plasma proteins discussed in this Chapter, and also on most other lab tests.)

Levinson W: *Review of Medical Microbiology and Immunology,* 11th ed. Appleton & Lange, 2010. (Good description of the basics of Immunology).

Murphy KM, Travers P, Walport M: *Janeway's Immunobiology,* 7th ed. Garland Science Publishing, 2007.

Schaller H, Gerber S, Kaempfer U, et al: *Human Blood Plasma Proteins: Structure and Function.* Wiley, 2008.

CAPÍTULO

51

Hemostasia e Trombose

Peter L. Gross, M.D., M.Sc., FRCP (C), Robert K. Murray, M.D., Ph.D. e Margaret L. Rand, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Compreender a importância da hemostasia e o significado da trombose na saúde e na doença.
- Esquematizar as vias da coagulação que levam à formação da fibrina.
- Identificar os fatores da coagulação dependentes da vitamina K.
- Fornecer exemplos de distúrbios genéticos que causam sangramento.
- Descrever o processo da fibrinólise.
- Delinear as etapas que levam à agregação das plaquetas.
- Identificar os fármacos antiplaquetários e seu mecanismo de inibição da agregação plaquetária.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Este capítulo irá descrever os aspectos básicos das proteínas do sistema da coagulação sanguínea e da fibrinólise. Serão também apresentados alguns aspectos fundamentais da biologia das plaquetas. Os estados hemorrágicos e trombóticos podem resultar em sérias emergências médicas, e a trombose das artérias coronárias e cerebrais constitui uma importante causa de morte em muitas partes do mundo. A abordagem racional dessas condições requer uma clara compreensão das bases da coagulação sanguínea, da fibrinólise e da ativação das plaquetas.

A HEMOSTASIA E A TROMBOSE POSSUEM TRÊS FASES EM COMUM

A **hemostasia** é a interrupção de sangramento a partir de um corte ou de um vaso seccionado, enquanto a **trombose** ocorre quando o endotélio que reveste os vasos sanguíneos é lesionado ou removido (p. ex., com a ruptura de uma placa aterosclerótica). Esses processos envolvem os vasos sanguíneos, a agregação plaquetária e as proteínas plasmáticas responsáveis pela formação ou dissolução dos agregados plaquetários e da fibrina.

Na hemostasia, ocorre vasoconstrição inicial do vaso lesionado, causando diminuição do fluxo sanguíneo distalmente à lesão. Em seguida, a hemostasia e a trombose compartilham **três fases**:

1. Formação de um **agregado de plaquetas** frouxo e temporário no local da lesão. As plaquetas ligam-se ao colágeno no local da lesão da parede do vaso, formam tromboxano A_2 e liberam ADP, que ativam outras plaquetas que estão circulando na vizinhança da lesão. (O mecanismo de ativação das plaquetas é descrito adiante.) A trombina, formada durante a coagulação no mesmo local, provoca maior ativação das plaquetas. Com a sua ativação, as plaquetas mudam de forma e, na presença de fibrinogênio e/ou do fator de von Willebrand, agregam-se para formar o tampão hemostático (na hemostasia) ou o trombo (na trombose.)
2. Constituição de uma **rede de fibrina** que se liga ao agregado de plaquetas, formando um tampão hemostático ou um trombo mais estável.
3. **Dissolução** parcial ou completa do tampão hemostático ou do trombo pela plasmina.

Existem três tipos de trombos

São identificados três tipos de trombos ou coágulos. Todos contêm **fibrina** em várias proporções.

1. O **trombo branco** é composto de plaquetas e fibrina e é relativamente pobre em eritrócitos. Forma-se no local de uma lesão ou de uma anormalidade da parede do vaso, particularmente em áreas onde o fluxo sanguíneo é rápido (artérias).
2. O **trombo vermelho** consiste principalmente em eritrócitos e fibrina. Assemelha-se morfologicamente a um coágulo for-

mado em tubo de ensaio e pode ser composto *in vivo* em áreas de fluxo sanguíneo retardado ou estase (p. ex., veias), com ou sem lesão vascular, ou pode ser produzido no local de uma lesão ou em um vaso anormal, em associação a um tampão plaquetário em formação.

3. O terceiro tipo consiste no **depósito de fibrina** em vasos sanguíneos muito pequenos ou capilares.

Primeiramente, será descrita a via da coagulação que leva à formação de fibrina. Em seguida, brevemente, serão descritos alguns aspectos da atuação das plaquetas e das paredes dos vasos sanguíneos no processo global. Essa separação entre fatores da coagulação e plaquetas é artificial, visto que ambos desempenham papéis íntimos e, com frequência, interdependentes na hemostasia e na trombose, porém é efetuada para facilitar a descrição dos processos globais envolvidos.

Tanto a via extrínseca quanto a via intrínseca levam à formação da fibrina

Duas vias levam à formação do **coágulo de fibrina**: as vias **extrínseca** e **intrínseca**. Estas não são independentes, como se acreditava anteriormente. Todavia, essa distinção artificial é mantida no texto para facilitar a sua descrição.

A formação de um coágulo de fibrina em resposta a uma **lesão tecidual** é efetuada pela **via extrínseca**. A **via intrínseca** é ativada por superfícies de carga negativa ***in vitro***, como, por exemplo, o vidro. Ambas as vias levam à ativação da **protrombina em trombina** e à clivagem do fibrinogênio catalisada pela trombina para formar o coágulo de **fibrina**. As vias são complexas e envolvem muitas proteínas diferentes (**Figuras 51-1 e 51-2; Tabela 51-1**). Em geral, como mostra a **Tabela 51-2**, essas proteínas podem ser classificadas em **cinco tipos**: (1) zimogênios de proteases dependentes de serina, que são ativados durante o processo da coagulação; (2) cofatores; (3) fibrinogênio; (4) uma transglutaminase, que estabiliza o coágulo de fibrina; e (5) proteínas reguladoras e outras proteínas.

A via extrínseca leva à ativação do fator X

A **via extrínseca** envolve o fator tecidual, os fatores VII e X e o Ca^{2+}, resultando na produção do fator Xa (por convenção, os fatores ativados da coagulação são designados pelo uso do sufixo a), a qual é iniciada no local de **lesão tecidual**, com a exposição do **fator tecidual** (Figura 51-1), localizado no subendotélio e nos monócitos ativados. O fator tecidual interage com o **fator VII** (53 kDa, um zimogênio que contém resíduos de γ-carboxiglutamato [Gla] dependentes de vitamina K; ver Capítulo 44), sintetizado no fígado, ativando-o. Convém assinalar que, nos zimogênios que contêm Gla (fatores II, VII, IX e X), os resíduos de Gla nas regiões aminoterminais das moléculas atuam como sítios de ligação de alta afinidade para o Ca^{2+}. O fator tecidual atua como cofator para o **fator VIIa**, aumentando a sua atividade enzimática para ativar o **fator X** (56 kDa). A reação pela qual o **fator X** é ativado requer a montagem de componentes, denominados **complexo de tenase extrínseco**, em uma superfície da membrana celular, expondo o fosfolipídeo procoagulante, o fosfatidilserina; esses componentes são o Ca^{2+}, o fator tecidual e os fatores VIIa e X. O fator VIIa cliva uma ligação Arg-Ile no fator X, produzindo

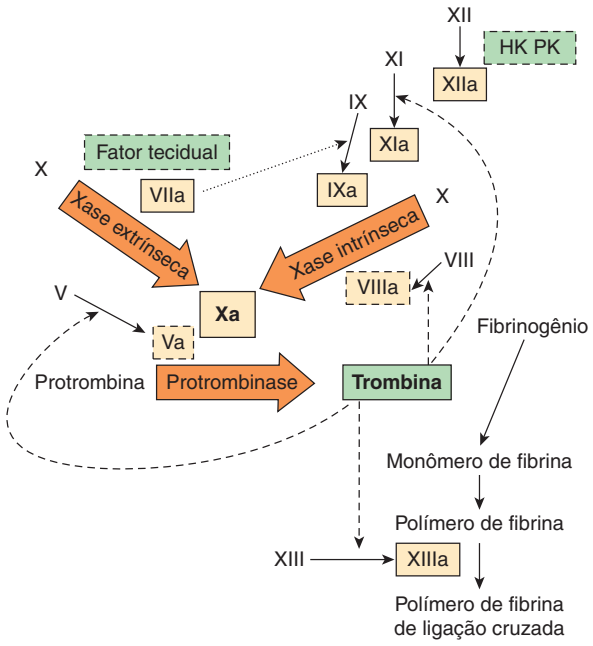


FIGURA 51-1 As vias da coagulação sanguínea, com a via extrínseca indicada na parte superior à esquerda, e a via intrínseca na parte superior à direita. As vias convergem na formação do fator Xa e culminam na formação da fibrina de ligação cruzada. Os complexos de fator tecidual e fator VIIa ativam não apenas o fator X (Xase [tenase] extrínseca), mas também o fator IX na via intrínseca (seta pontilhada). Além disso, a retroalimentação da trombina ativa os sítios indicados (setas tracejadas) e também ativa o fator VII em fator VIIa (não ilustrado). Os três complexos predominantes, a Xase extrínseca, a Xase intrínseca e a protrombinase estão indicados nas setas; as reações exigem a presença de fosfolipídeo procoagulante aniônico da membrana e de cálcio. As proteases ativadas estão representadas nos retângulos com linhas cheias, enquanto os cofatores ativados estão representados em retângulos com linhas tracejadas; os fatores inativos não estão em retângulos (HK, cininogênio de alto peso molecular; PK, pré-calicreína.)

o serino protease de duas cadeias, o **fator Xa**. O fator tecidual e o fator VIIa também ativam o fator IX na via intrínseca. Com efeito, **a formação de complexos entre o fator tecidual e o fator VIIa é atualmente considerada como o processo essencial envolvido na coagulação sanguínea *in vivo***.

O inibidor da via do fator tecidual (**TFPI**) é um importante inibidor fisiológico da coagulação. Trata-se de uma proteína que circula no sangue associada a lipoproteínas. O TFPI inibe diretamente o fator Xa por meio de sua ligação à enzima próxima a seu sítio ativo. Em seguida, esse complexo de fator Xa-TFPI inibe o complexo de fator VIIa-fator tecidual.

A via intrínseca também leva à ativação do fator X

A ativação do **fator Xa** constitui o principal local onde as vias intrínseca e extrínseca convergem (Figura 51-1). A **via intrínseca** (Figura 51-1) envolve os fatores XII, XI, IX, VIII e X, bem como a pré-calicreína, o cininogênio de alto peso molecular (HMW), o Ca^{2+} e fosfolipídeo. Resulta na produção do **fator Xa**, que é clivado pelo complexo da tenase, em que o fator IXa é o serino protease, e o

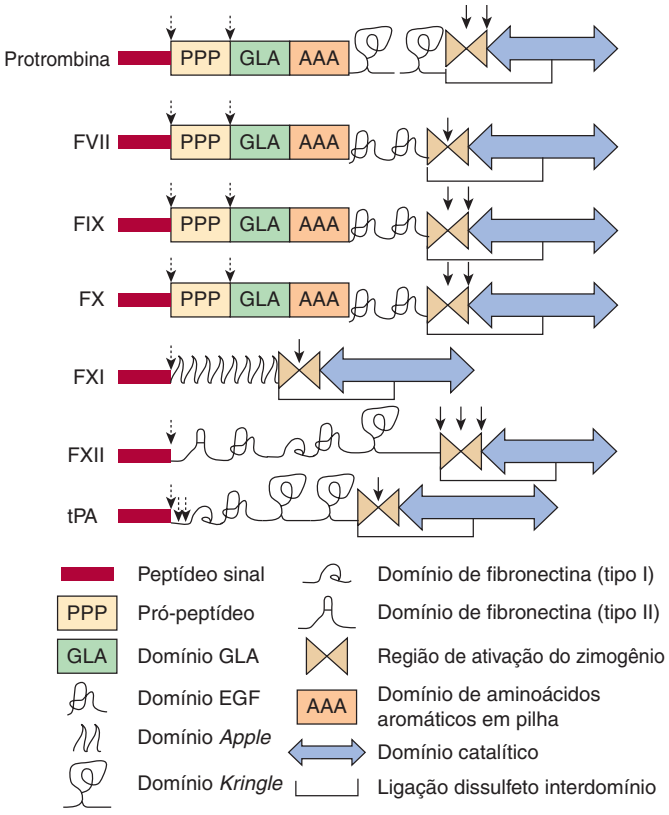


FIGURA 51-2 Os domínios estruturais de proteínas selecionadas envolvidas na coagulação e na fibrinólise. Os domínios são identificados na base da figura e incluem o peptídeo sinal, o pró-peptídeo, o domínio Gla (γ-carboxiglutamato), o domínio do fator de crescimento epidérmico (EGF), o domínio *apple*, o domínio *kringle*, o domínio da fibronectina (tipos I e II), a região de ativação do zimogênio, o domínio de aminoácidos aromáticos em pilha e o domínio catalítico. As ligações dissulfeto interdomínio estão indicadas, enquanto numerosas ligações dissulfeto intradomínio não estão ilustradas. Os sítios de clivagem proteolítica na síntese ou ativação estão indicados por setas (tracejadas e contínuas, respectivamente). FVII, fator VII; FIX, fator IX; FX, fator X, FXI, fator XI; FXII, fator XII; t-PA, ativador do plasminogênio tecidual (Adaptada, com autorização, de Furie B, Furie BC: The molecular basis of blood coagulation. Cell 1988;53:505.)

TABELA 51-1 Sistema numérico para a nomenclatura dos fatores da coagulação

Fator		Nome comum
I II III	Fibrinogênio Protrombina Fator tecidual	Esses fatores são geralmente designados pelos seus nomes comuns
IV	Ca^{2+}	O Ca^{2+} não é habitualmente designado como fator da coagulação
V	Proacelerina, fator lábil, globulina aceleradora (Ac-)	
VII[1]	Proconvertina, acelerador sérico da conversão de protrombina (SPCA), cotromboplastina	
VIII	Fator anti-hemofílico A, globulina anti-hemofílica (AHG)	
IX	Fator anti-hemofílico B, fator *Christmas*, componente tromboplastínico plasmático (PTC)	
X	Fator de Stuart-Prower	
XI	Antecedente da tromboplastina plasmática (PTA)	
XII	Fator de Hageman	
XIII	Fator estabilizador da fibrina (FSF), fibrinoligase	

Nota: Os números indicam a ordem pela qual os fatores foram descobertos e não têm nenhuma ligação com a sequência na qual atuam.
[1] Não existe fator VI.

fator VIIIa, o cofator da via intrínseca. A ativação do **fator X** estabelece uma importante **ligação** entre as vias intrínseca e extrínseca.

A **via intrínseca** pode começar com a "fase de contato", em que a pré-calicreína, o cininogênio HMW, o fator XII e o fator XI são expostos a uma superfície ativadora de carga negativa. O caulim pode ser usado em testes *in vitro* como iniciador da via intrínseca. Quando ocorre montagem dos componentes da fase de contato sobre a superfície ativadora, o fator XII é ativado em **fator XIIa** mediante proteólise pela calicreína. Esse fator XIIa, gerado pela calicreína, ataca a pré-calicreína para gerar mais calicreína, estabelecendo uma relação recíproca. Uma vez formado, o fator XIIa ativa o **fator XI** em **XIa** e também libera **bradicinina** (um nonapeptídeo com potente ação vasodilatadora) a partir do cininogênio HMW.

O fator XIa, na presença de Ca^{2+}, ativa o fator IX (55 kDa, um zimogênio que contém Gla) no serino protease, o **fator IXa**. Este, por sua vez, também cliva uma ligação Arg-Ile no fator X, produzindo o **fator Xa**. Esta última reação requer a montagem dos componentes, constituindo o denominado **complexo de tenase intrínseco** na superfície da membrana: o Ca^{2+} e o fator VIIIa, bem como os fatores IXa e X.

O **fator VIII** (330 kDa), uma glicoproteína circulante, não é um precursor de protease, mas um cofator que atua como receptor para os fatores IXa e X sobre a superfície das plaquetas. O fator VIII é ativado por quantidades mínimas de trombina para formar o **fator VIIIa** que, por sua vez, é inativado por clivagem adicional pela trombina.

O papel das **etapas iniciais da via intrínseca** na iniciação da coagulação tem sido questionado, já que pacientes com uma deficiência hereditária de fator XII, pré-calicreína ou cininogênio HMW não apresentam problemas de sangramento. De forma semelhante, pacientes com deficiência de fator XI podem não ter problemas hemorrágicos. A via intrínseca serve, em grande parte, para **amplificar o fator Xa** e, em última análise, para **formação da trombina** por meio de mecanismos de retroalimentação (ver adiante). A via intrínseca também pode ser importante na **fibrinólise** (ver adiante), uma vez que a calicreína, o fator XIIa e o fator XIa podem clivar o plasminogênio, e a calicreína pode ativar a uroquinase de cadeia simples.

O fator Xa leva à ativação da protrombina em trombina

O **fator Xa**, produzido tanto pela via extrínseca quanto pela via intrínseca, ativa a **protrombina** (fator II) em **trombina** (fator IIa) (Figura 51-1).

TABELA 51-2 Funções das proteínas envolvidas na coagulação sanguínea

Zimogênios de serino proteases	
Fator XII	Liga-se a superfícies de carga negativa, como, por exemplo, caulim e vidro; ativado pelo cininogênio de alto peso molecular e pela calicreína
Fator XI	Ativado pelo fator XIIa
Fator IX	Ativado pelo fator XIa e fator VIIa
Fator VII	Ativado pelo fator VIIa, fator Xa e trombina
Fator X	Ativado na superfície das plaquetas ativadas pelo complexo de tenase (Ca^{2+}, fatores VIIIa e IXa) e pelo fator VIIa na presença de fator tecidual e Ca^{2+}
Fator II	Ativado na superfície das plaquetas ativadas pelo complexo da protrombinase (Ca^{2+}, fatores Va e Xa) [Os fatores II, VII, IX e X são zimogênios que contêm Gla] (Gla = γ-carboxiglutamato)
Cofatores	
Fator VIII	Ativado pela trombina; o fator VIIIa é um cofator na ativação do fator X pelo fator IXa
Fator V	Ativado pela trombina; o fator Va é um cofator na ativação da protrombina pelo fator Xa
Fator tecidual (fator III)	Glicoproteína localizada no subendotélio e expressa nos monócitos ativados para atuar como cofator para o fator VIIa
Fibrinogênio	
Fator I	Clivado pela trombina para formar o coágulo de fibrina
Transglutaminase dependente de tiol	
Fator XIII	Ativado pela trombina; estabiliza o coágulo de fibrina por ligação cruzada covalente
Proteínas reguladoras e outras proteínas	
Proteína C	Ativada em proteína C ativada (APC) pela trombina ligada à trombomodulina; em seguida, degrada os fatores VIIIa e Va
Proteína S	Atua como cofator da proteína C; ambas as proteínas contêm resíduos de Gla (γ-carboxiglutamato)
Trombomodulina	Proteína presente na superfície das células endoteliais; liga-se à trombina que, em seguida, ativa a proteína C

A ativação da protrombina, como a do fator X, ocorre sobre uma superfície de membrana e requer a montagem de um **complexo de protrombinase**, que consiste em Ca^{2+}, fator Va, fator Xa e protrombina. A montagem dos complexos de protrombinase e tenase ocorre na superfície das membranas das plaquetas ativadas para expor o fosfolipídeo ácido (aniônico), a **fosfatidilserina**, que normalmente está localizada no lado interno da membrana plasmática das plaquetas não ativadas em repouso.

O **fator V** (330 kDa), glicoproteína que exibe homologia com o fator VIII e com a ceruloplasmina, é sintetizado no fígado, no baço e nos rins e ocorre nas plaquetas, bem como no plasma. Atua como cofator, de modo semelhante ao do fator VIII no complexo da tenase; quando ativado a **fator Va** por traços de trombina, liga-se especificamente à membrana plaquetária (**Figura 51-3**) e forma um complexo com o fator Xa e a protrombina. Subsequentemente, é inativado pela proteína C ativada (ver adiante), assegurando, assim, um meio de limitar a ativação da protrombina em trombina. A **protrombina** (72 kDa; Figura 51-3) é uma glicoproteína de cadeia única sintetizada no fígado; sua região aminoterminal (Figura 51-2) contém 10 resíduos de Gla, e o sítio ativo de protease dependente de serina encontra-se no domínio catalítico próximo à região carboxiterminal da molécula. Após ligar-se ao complexo dos fatores Va e Xa na membrana da plaqueta (Figura 51-3), a protrombina é clivada pelo fator Xa em dois sítios para gerar a molécula ativa de trombina de duas cadeias, que é então liberada da superfície plaquetária.

A conversão do fibrinogênio em fibrina é catalisada pela fibrina

A **trombina**, produzida pelo complexo da protrombinase, além de exercer um poderoso efeito estimulador sobre as plaquetas (ver adiante), **converte o fibrinogênio em fibrina** (Figura 51-1). O **fibrinogênio** (fator I, 340 kDa; ver Figuras 51-1 e 51-4; Tabelas 51-1 e 51-2) é uma glicoproteína plasmática solúvel, que consiste em três pares não idênticos de cadeias polipeptídicas (Aα, Bβ, γ)$_2$ ligados de modo covalente por ligações de dissulfeto. As cadeias Bβ e γ contêm oligossacarídeos complexos ligados à asparagina. Todas as três cadeias são sintetizadas no fígado; os três genes estão no mesmo cromossomo, e a sua expressão é regulada de modo coordenado nos seres humanos. As regiões aminoterminais das seis cadeias são mantidas em estreita proximidade por diversas ligações de dissulfeto, enquanto as regiões carboxiterminais são separadas, originando uma molécula alongada e altamente assimétrica (**Figura 51-4**).

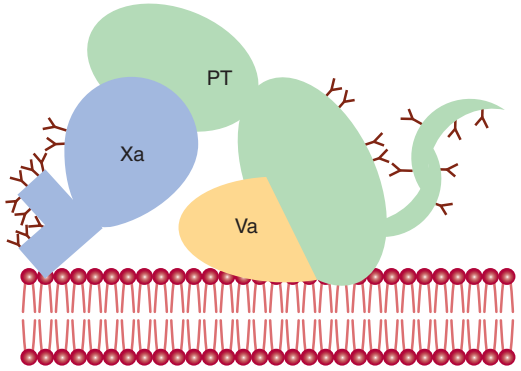


FIGURA 51-3 Representação diagramática (fora da escala) da ligação dos fatores Va, Xa e da protrombina (PT) à membrana plasmática da plaqueta ativada. Um tema central na coagulação do sangue consiste na montagem de complexos de proteína sobre a superfície das membranas. Os resíduos de γ-carboxiglutamato (indicados por Y) nas proteínas dependentes de vitamina K ligam-se ao cálcio e contribuem para a exposição dos sítios de ligação da membrana nessas proteínas. (Adaptada, com autorização, de Furie B, Furie BC: The molecular basis of blood coagulation. Cell 1988;53:505.)

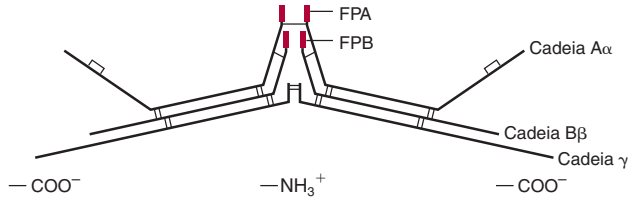


FIGURA 51-4 Representação diagramática (fora da escala) do fibrinogênio, mostrando os pares de cadeias Aα, Bβ e γ ligados por ligações dissulfeto. (FPA, fibrinopeptídeo A; FPB, fibrinopeptídeo B.)

As porções Aα e Bβ das cadeias A e B, designadas como **fibrinopeptídeo A** (**FPA**) e **fibrinopeptídeo B** (**FPB**), respectivamente, estão localizadas nas extremidades aminoterminais das cadeias e apresentam um excesso de cargas negativas, devido à presença de resíduos de aspartato e glutamato, bem como de uma tirosina O-sulfato incomum no FPB. Essas cargas negativas contribuem para a solubilidade do fibrinogênio no plasma e também servem para impedir a agregação ao produzir uma repulsão eletrostática entre as moléculas de fibrinogênio.

A **trombina** (34 kDa), serino protease formada pelo complexo da protrombinase, hidrolisa as quatro ligações Arg-Gly entre os fibrinopeptídeos e as porções α e β das cadeias Aα e Bβ do fibrinogênio (**Figura 51-5A**). A liberação dos fibrinopeptídeos pela trombina gera o **monômero de fibrina**, que apresenta a estrutura de subunidades $(\alpha, \beta, \gamma)_2$. Como o FPA e o FPB contêm apenas 16 e 14 resíduos, respectivamente, a molécula de fibrina conserva 98% dos resíduos presentes no fibrinogênio. A remoção dos fibrinopeptídeos expõe os sítios de ligação que permitem às moléculas de monômero de fibrina sofrer agregação espontânea em uma disposição regularmente alternada, formando um coágulo de fibrina insolúvel. Esse coágulo inicial de fibrina é bastante fraco, unido apenas pela associação não covalente de monômeros de fibrina.

Além da conversão do fibrinogênio em fibrina, a trombina também converte o **fator XIII** em **fator XIIIa**, o qual é uma **transglutaminase** altamente específica, que efetua ligações cruzadas covalentes das moléculas de fibrina por meio da formação de ligações peptídicas entre os grupos amida da glutamina e os grupos ε-amino dos resíduos de lisina (**Figura 51-5B**), produzindo um coágulo de fibrina mais estável, com resistência aumentada à protease. Essa rede de fibrina serve para estabilizar o tampão hemostático ou o trombo.

Os níveis de trombina circulante são cuidadosamente controlados

Uma vez formada durante a hemostasia ou em caso de trombose, a trombina ativa deve ter a sua concentração cuidadosamente controlada para impedir qualquer excesso de formação de fibrina ou ativação das plaquetas. Esse controle é obtido de **duas maneiras**. A trombina circula na forma de seu precursor inativo, a protrombina, a qual é ativada em consequência de uma cascata de reações enzimáticas, em que cada uma converte um zimogênio inativo em uma enzima ativa, levando finalmente à conversão da protrombina em trombina (Figura 51-1). Em cada ponto da cascata, **mecanismos de retroalimentação** produzem um delicado equilíbrio entre ativação e inibição. A concentração plasmática do fator XII é de aproximadamente 30 μg/mL, enquanto a do fibrinogênio é de 3 mg/mL, com aumento na concentração dos fatores intermediários da coagulação à medida que a cascata prossegue, demonstrando que a cascata da coagulação proporciona uma **amplificação**. A segunda maneira de controlar a atividade da trombina consiste na **inativação de qualquer trombina** formada por **inibidores circulantes**, dos quais o mais importante é a antitrombina (ver adiante).

A heparina aumenta a atividade da antitrombina, um inibidor da trombina

No plasma normal, existem **quatro inibidores da trombina** de ocorrência natural. O mais importante é a **antitrombina**, que contribui com aproximadamente 75% da atividade da antitrombina, e também pode inibir a atividade dos fatores IXa, Xa, XIa, XIIa e do complexo formado pelo fator VIIa com o fator tecidual.

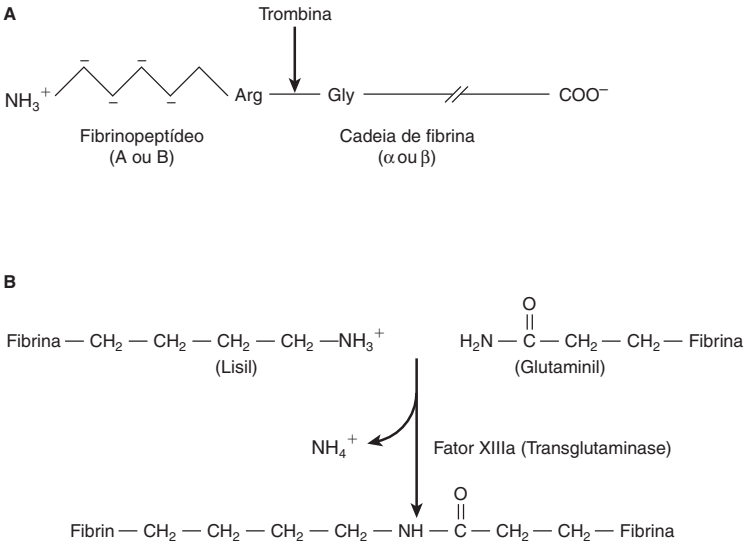


FIGURA 51-5 Formação de um coágulo de fibrina. (**A**) Clivagem induzida pela trombina das ligações Arg-Gly das cadeias Aα e Bβ do fibrinogênio para produzir os fibrinopeptídeos (lado esquerdo) e as cadeias α e β do monômero de fibrina (lado direito). (**B**) Ligação cruzada das moléculas de fibrina pelo fator XIII ativado (fator XIIIa).

A **α_2-macroglobulina** contribui com a maior parte do restante da atividade de antitrombina, enquanto o **cofator II da heparina** e a **α_1-antitripsina** atuam como inibidores de menor importância em condições fisiológicas.

A atividade endógena da antitrombina é acentuadamente potencializada pela presença de glicosaminoglicanos sulfatados (heparans) (Capítulo 48). Esses glicosaminoglicanos ligam-se a um sítio catiônico específico da antitrombina, induzindo uma mudança de conformação e promovendo a sua ligação à trombina, bem como a ligação a seus outros substratos. Esta é a base para o uso da **heparina**, um heparan derivatizado, na medicina clínica para inibir a coagulação. Os efeitos anticoagulantes da heparina podem ser antagonizados por polipeptídeos fortemente catiônicos, como a **protamina**, que se ligam fortemente à heparina, inibindo, assim, a sua ligação à trombina.

As **heparinas de baixo peso molecular** (**HBPM**), derivadas da clivagem enzimática ou química da heparina não fracionada, estão sendo usadas clinicamente. Podem ser administradas por via subcutânea em regime domiciliar, apresentam maior disponibilidade do que a heparina não fracionada e não exigem monitoração laboratorial frequente.

Os indivíduos com **deficiências hereditárias de antitrombina** são propensos a desenvolver trombose venosa, fornecendo uma evidência de que a antitrombina desempenha uma função fisiológica, e que o sistema da coagulação nos seres humanos encontra-se, normalmente, em um estado dinâmico.

A **trombina** está envolvida em outro mecanismo regulador que opera na coagulação: ela combina-se com a **trombomodulina**, uma glicoproteína presente na superfície das células endoteliais. O complexo ativa a **proteína C** no **receptor de proteína C endotelial**. Em combinação com a **proteína S**, a proteína C ativada (APC) degrada os fatores Va e VIIIa, limitando suas ações na coagulação. Uma deficiência genética tanto de proteína C quanto de proteína S pode causar trombose venosa. Além disso, os pacientes com o **fator V de Leiden** (que apresenta um resíduo de glutamina em vez de arginina na posição 506) correm risco aumentado de doença trombótica venosa, visto que o fator V de Leiden é resistente à inativação pela APC. Essa condição é denominada resistência à APC.

Os anticoagulantes cumarínicos inibem a carboxilação dos fatores II, VII, IX e X dependentes de vitamina K

Os **fármacos cumarínicos** (p. ex., varfarina), usados como anticoagulantes, inibem a carboxilação dependente de vitamina K dos resíduos Glu em Gla (ver Capítulo 44), presentes nas regiões aminoterminais dos fatores II, VII, IX e X, bem como nas proteínas C e S. Essas proteínas, que são sintetizadas no fígado, dependem das propriedades de ligação dos resíduos de Gla ao Ca^{2+} para a sua função normal nas vias da coagulação. Os cumarínicos atuam ao **inibir a redução dos derivados quinona da vitamina K nas formas hidroquinona ativas** (Capítulo 44). Por conseguinte, a administração de vitamina K evita a inibição induzida pelos cumarínicos e possibilita a ocorrência da modificação pós-tradução de carboxilação. A **reversão** da inibição dos cumarínicos pela vitamina K requer 12 a 24 h, enquanto a reversão dos efeitos anticoagulantes da heparina pela protamina é quase instantânea.

A **heparina** e a **varfarina** são amplamente usadas no tratamento de condições trombóticas e tromboembólicas, como trombose venosa profunda e embolia pulmonar. A heparina é administrada em primeiro lugar, em virtude de sua ação de início imediato, enquanto a varfarina leva vários dias para alcançar o seu efeito integral. Seus efeitos são rigorosamente monitorados pelo uso de testes apropriados da coagulação (ver adiante), devido ao risco de provocar hemorragia.

Os **novos inibidores orais** da trombina (dabigatrana) ou do fator Xa (rivaroxabana e outros) também são utilizados no tratamento das condições trombóticas.

Existem vários distúrbios hemorrágicos hereditários, incluindo a hemofilia A

Nos seres humanos, ocorrem **deficiências hereditárias** do sistema da coagulação, resultando em sangramento. A deficiência mais comum é a do fator VIII, que causa a **hemofilia A**, uma doença ligada ao cromossomo X. A **hemofilia B**, **também ligada ao cromossomo X**, é causada por uma deficiência de fator IX e, recentemente, foi identificada como a forma de hemofilia que desempenhou um importante papel na história das famílias reais da Europa; suas manifestações clínicas são quase idênticas às da hemofilia A. Todavia, essas duas condições podem ser diferenciadas com base em ensaios específicos que distinguem entre os dois fatores.

O **gene do fator VIII humano** foi clonado e é um dos maiores estudados até hoje, medindo 186 kb de comprimento e contendo 26 éxons. Foi detectada uma variedade de mutações dos genes dos fatores VIII e IX, levando a uma redução nas atividades das proteínas destes fatores; essas mutações incluem deleções parciais do gene e mutações pontuais e de sentido incorreto. Atualmente, é possível estabelecer o **diagnóstico pré-natal** pela análise do DNA após a obtenção de amostra das vilosidades coriônicas.

No passado, o tratamento dos pacientes com hemofilia A e B consistia na administração de **crioprecipitados** (enriquecidos com fator VIII), preparados a partir de doadores individuais, ou de **concentrados** liofilizados de fator VIII ou IX, preparados a partir de misturas muito grandes de plasma. Assim, hoje é possível preparar os fatores VIII e IX pela **tecnologia do DNA recombinante**. Essas preparações são desprovidas de vírus (p. ex., vírus das hepatites A, B, C ou HIV-1) encontrados no plasma humano; todavia, são de alto custo, e o seu uso pode aumentar se houver uma redução no custo de produção.

O distúrbio hemorrágico hereditário mais comum é a **doença de von Willebrand**, com prevalência de até 1% da população. A doença resulta de uma deficiência ou de um defeito do **fator de von Willebrand**, grande glicoproteína multimérica secretada pelas células endoteliais e plaquetas do plasma, onde estabiliza o fator VIII. O fator de von Willebrand também promove a adesão das plaquetas nos locais de lesão da parede vascular (ver adiante).

Os coágulos de fibrina são dissolvidos pela plasmina

Conforme assinalado anteriormente, o sistema da coagulação encontra-se, normalmente, em um estado de equilíbrio dinâmico, em que os coágulos de fibrina são constantemente deposi-

tados e dissolvidos. Esse último processo é denominado **fibrinólise**. A **plasmina**, a principal serino protease responsável pela degradação da fibrina e do fibrinogênio, circula na forma de seu zimogênio inativo, o **plasminogênio** (90 kDa), e qualquer quantidade pequena de plasmina formada na fase líquida, em condições fisiológicas, é rapidamente inativada pelo inibidor da plasmina de ação rápida, a α_2-antiplasmina. O plasminogênio liga-se à fibrina e, assim, incorpora-se aos coágulos à medida que são produzidos; já que a plasmina que é formada quando ligada à fibrina é protegida da ação da α_2-antiplasmina, ela permanece ativa. Na maioria dos tecidos do corpo, são encontrados **ativadores do plasminogênio** de vários tipos, que clivam a mesma ligação Arg-Val no plasminogênio, produzindo a plasmina, uma serino protease de duas cadeias (**Figura 51-6**). A **especificidade da plasmina pela fibrina** é outro mecanismo que regula a fibrinólise. Por meio de um de seus domínios *kringle*, a plasmina (plasminogênio) liga-se especificamente a resíduos de lisina na fibrina e, dessa maneira, incorpora-se progressivamente à rede de fibrina que a cliva. (Os domínios *kringle* [Figura 51-2] são motivos proteicos comuns com comprimento de cerca de 100 resíduos de aminoácidos que apresentam uma estrutura covalente característica definida por um padrão de três pontes dissulfeto.) Portanto, a carboxipeptidase **TAFIa** (**inibidor da fibrinólise ativável por trombina ativada**) (**Figura 51-7**), que remove as lisinas terminais da fibrina, tem a capacidade de inibir a fibrinólise. A fibrina ativa o TAFI em TAFIa, inibindo, assim, a fibrinólise durante a formação do coágulo.

O **ativador do plasminogênio tecidual** (**t-PA**) (Figuras 51-2 e 51-7) é uma serino protease que é liberada na circulação a partir do endotélio, em condições de lesão ou de estresse, e que é cataliticamente inativa, a menos que esteja ligada à fibrina. Devido a ligação à fibrina, o t-PA cliva o plasminogênio dentro do coágulo para gerar plasmina que, por sua vez, digere a fibrina para formar produtos de degradação solúveis e, assim, dissolver o coágulo. Nem a plasmina nem o ativador do plasminogênio podem permanecer ligados a esses produtos de degradação e, portanto, são liberados na fase líquida, onde são inativados pelos seus inibidores naturais. A pró-uroquinase é o precursor de um segundo ativador do plasminogênio, a **uroquinase**. Originalmente isolada da urina, sabe-se, hoje, que ela é sintetizada por células como os monócitos e macrófagos, os fibroblastos e as células epiteliais. Sua principal ação consiste, provavelmente, na degradação da matriz extracelular. A Figura 51-7 indica os locais de ação de cinco proteínas que influenciam a ação e a formação da plasmina.

O t-PA recombinante e a estreptoquinase são usados como destruidores dos coágulos

A **alteplase**, o t-PA produzido por tecnologia do DNA recombinante, é usada terapeuticamente como agente fibrinolítico, assim como a **estreptoquinase**. Entretanto, esta última é menos seletiva do que o t-PA, ativando o plasminogênio na fase líquida (onde pode degradar o fibrinogênio circulante), bem como aquele ligado a um coágulo de fibrina. A quantidade de plasmina produzida por doses terapêuticas de estreptoquinase pode ultrapassar a capacidade da α_2-antiplasmina circulante, causando a degradação do fibrinogênio, bem como da fibrina, e resultando no sangramento que frequentemente ocorre durante a terapia fibrinolítica. Devido à sua **seletividade** relativa para degradar a fibrina, o t-PA recombinante tem sido amplamente usado para restaurar a desobstrução das artérias coronárias após a ocorrência de trombose. Quando administrado cedo o suficiente, antes que ocorra lesão irreversível do músculo cardíaco (cerca de 6 h após o início da trombose), o t-PA pode reduzir significativamente a taxa de mortalidade da lesão miocárdica após a trombose coronária. A estreptoquinase também tem sido amplamente usada no tratamento da trombose coronária, porém possui a desvantagem de ser antigênica.

O t-PA também tem sido utilizado no tratamento do acidente vascular encefálico sistêmico isquêmico, da oclusão arterial periférica e da embolia pulmonar.

Existem diversos distúrbios, incluindo o câncer e a sepse, em que ocorre **aumento das concentrações dos ativadores do plasminogênio**. Além disso, a **atividade de antiplasmina**, que é exercida pela α_1-antitripsina e pela α_2-antiplasmina, pode estar comprometida em doenças como a cirrose. Já que determinados produtos bacterianos, como a estreptoquinase, são capazes de ativar o plasminogênio, eles podem ser responsáveis pela hemorragia difusa algumas vezes observada em pacientes com infecções bacterianas disseminadas.

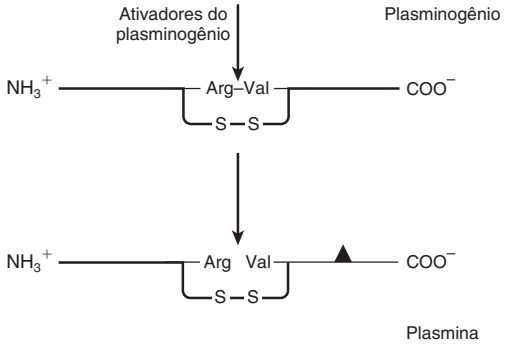


FIGURA 51-6 Ativação do plasminogênio. A mesma ligação Arg-Val é clivada por todos os ativadores do plasminogênio para dar origem à molécula de plasmina de duas cadeias. O triângulo sólido indica o resíduo de serina do sítio ativo. As duas cadeias de plasmina são mantidas unidas por uma ponte dissulfeto.

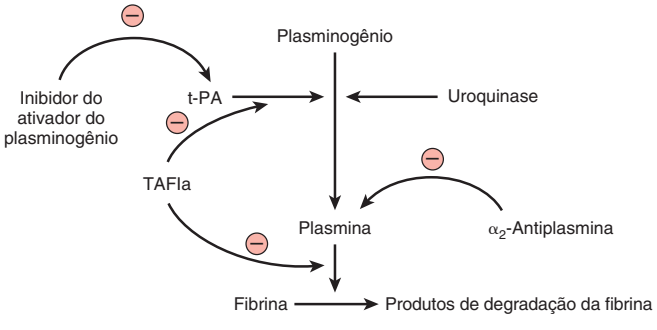


FIGURA 51-7 Iniciação da fibrinólise pela ativação da plasmina. Esquema que demonstra os locais de ação do ativador do plasminogênio tecidual (t-PA), da uroquinase, do inibidor do ativador do plasminogênio, da α_2-antiplasmina e do inibidor da fibrinólise ativável por trombina (TAFIa) (essas últimas três proteínas exercem ações inibitórias).

A agregação plaquetária requer uma sinalização transmembrana de fora para dentro e de dentro para fora

As plaquetas circulam normalmente em uma forma discoide não estimulada. Durante a hemostasia ou em caso de trombose, as plaquetas sofrem **ativação** e ajudam a formar o tampão hemostático ou o trombo. Três etapas principais estão envolvidas: (1) a adesão ao colágeno exposto nos vasos sanguíneos, (2) a liberação (exocitose) do conteúdo dos grânulos de armazenamento e (3) a agregação.

As **plaquetas aderem ao colágeno** por meio de receptores específicos situados na superfície da plaqueta, incluindo os complexos de glicoproteína GPIa-IIa (integrina α2β1; Capítulo 52) e GPIb-IX-V, bem como GPVI. A ligação do complexo GPIb-IX-V ao colágeno é mediada pelo fator de von Willebrand; essa interação é particularmente importante na aderência das plaquetas ao subendotélio nas condições de alto estresse de cisalhamento que ocorrem nos pequenos vasos e artérias parcialmente estenosadas.

As plaquetas que aderem ao colágeno alteram a sua forma e disseminam-se sobre o subendotélio. Liberam o conteúdo de seus **grânulos de armazenamento** (os grânulos densos e os grânulos α); a secreção é também estimulada pela trombina.

A **trombina**, formada a partir da cascata da coagulação, é o ativador mais potente das plaquetas, que inicia a ativação ao interagir com seus receptores PAR (receptor ativado por protease), como o PAR-1, PAR-4 e GPIb-IX-V, sobre a membrana plasmática das plaquetas (**Figura 51-8A**). Os eventos subsequentes que levam à ativação das plaquetas após a ligação ao PAR-1 e ao PAR-4 fornecem exemplos de **sinalização transmembrana** de fora para dentro, em que um mensageiro químico fora da célula gera moléculas efetoras dentro da célula. Nesse caso, a trombina atua como mensageiro químico externo (estímulo ou agonista). A interação da trombina com seus receptores acoplados à proteína G, PAR-1 e PAR-4 estimula a atividade de uma **fosfolipase Cβ** intracelular. Essa enzima hidrolisa o fosfolipídeo da membrana, o **fosfatidilinositol-4,5-bifosfato** (PIP_2, um polifosfoinositídeo), para formar duas moléculas efetoras internas, o 1,2-diacilglicerol e o 1,4,5-inositol-trifosfato.

A hidrólise do PIP_2 também está envolvida na ação de muitos hormônios e fármacos. O **diacilglicerol** estimula a **proteína quinase C**, a qual fosforila a proteína **plecstrina** (47 kDa). Isso resulta na agregação e liberação dos conteúdos dos grânulos de armazenamento. O ADP liberado dos grânulos densos também pode ativar as plaquetas por meio de seus receptores específicos acoplados à proteína G (Figura 51-8A), resultando em agregação de mais plaquetas. O **IP_3** causa a liberação de Ca^{2+} para dentro do citosol, principalmente a partir do sistema tubular denso (ou retículo endoplasmático liso residual do megacariócito) que, a seguir, interage com a calmodulina e a quinase da cadeia leve da miosina, determinando a fosforilação das cadeias leves de miosina. A seguir, essas cadeias interagem com a actina, causando modificações na forma da plaqueta.

A ativação de uma **fosfolipase A_2 citosólica** plaquetária induzida pelo colágeno por níveis elevados de Ca^{2+} intracelular resulta na liberação de ácido araquidônico dos fosfolipídeos da membrana plaquetária, levando à formação de **tromboxano A_2** (Capítulo 23). Por sua vez, o tromboxano A_2, ao ligar-se a seu receptor TP acoplado à proteína G, pode ativar ainda mais a fosfolipase C, promovendo a agregação plaquetária (Figura 51-8A).

Além de formar um agregado, as plaquetas ativadas aceleram a **ativação do fator X e da protrombina** pela exposição do fosfolipídeo aniônico, a fosfatidilserina, sobre a superfície da membrana (Figura 51-1).

Todos os **agentes agregadores**, incluindo a trombina, o colágeno, o ADP e outros, como o fator de ativação das plaquetas, através da via de sinalização de dentro para fora, modificam o **complexo de glicoproteína GPIIb-IIIa** (αIIbβ3; Capítulo 52) da superfície plaquetária, de modo que o receptor tenha maior afinidade pelo **fibrinogênio** ou pelo **fator de von Willebrand** (**Figura 51-8B**). Em seguida, as moléculas de fibrinogênio divalentes ou o fator de von Willebrand multivalente ligam plaquetas ativadas adjacentes entre si, formando um agregado plaquetário. Ocorre agregação plaquetária mediada pelo fator de von Willebrand em condições de alto estresse de cisalhamento. Alguns agentes, incluindo a epinefrina, a serotonina e a vasopressina, exercem efeitos sinérgicos com outros agentes agregadores.

As células endoteliais sintetizam prostaciclina e outros compostos que afetam a coagulação e a trombose

As **células endoteliais** nas paredes dos vasos sanguíneos contribuem de modo significativo para a regulação global da hemostasia e da trombose. Conforme descrito no Capítulo 23, essas células sintetizam o prostanoide **prostaciclina** (PGI_2), um potente inibidor da agregação plaquetária. A prostaciclina atua ao estimular a atividade da adenilil-ciclase nas membranas superficiais das plaquetas por meio de seu receptor acoplado à proteína G (Figura 51-8A). A consequente elevação do **AMPc** intraplaquetário opõe-se ao aumento do nível de Ca^{2+} intracelular produzido pelo IP_3 e, portanto, inibe a ativação das plaquetas. Isso contrasta com o efeito do prostanoide tromboxano A_2, formado pelas plaquetas ativadas, que consiste na promoção da agregação. As células endoteliais desempenham outros papéis na regulação da trombose. Por exemplo, essas células apresentam uma **ADPase**, que hidrolisa o ADP e que, desta forma, se opõe ao efeito agregador do ADP sobre as plaquetas. Além disso, essas células parecem sintetizar **o heparan sulfato**, um anticoagulante, assim como sintetizam os **ativadores do plasminogênio**, que podem ajudar a dissolver os trombos. A **Tabela 51-3** fornece uma lista de algumas moléculas produzidas pelas células endoteliais que afetam a trombose e a fibrinólise. O **óxido nítrico** (o fator de relaxamento derivado do endotélio) é discutido no Capítulo 49.

A análise dos mecanismos de captação das **lipoproteínas aterogênicas**, como as LDL, pelas células endoteliais, células do músculo liso e células monocíticas das artérias, juntamente com os estudos detalhados de como essas lipoproteínas provocam lesão dessas células, constitui uma área fundamental na pesquisa que visa a elucidação dos mecanismos da **aterosclerose** (Capítulo 26).

O ácido acetilsalicílico é um de vários fármacos antiplaquetários efetivos

Determinados **fármacos** (fármacos antiplaquetários) inibem as respostas das plaquetas. O fármaco antiplaquetário mais comu-

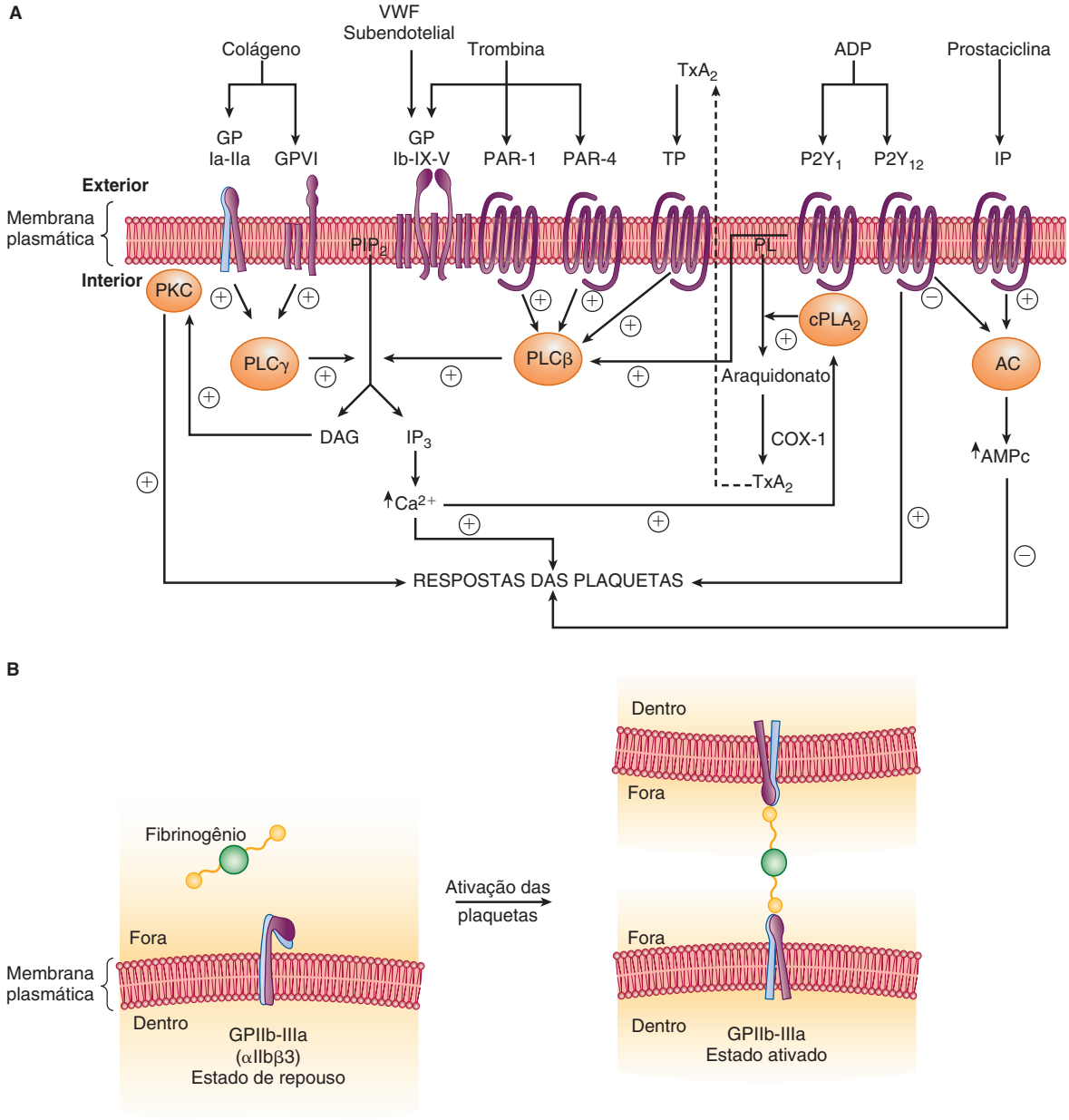


FIGURA 51-8 (A) Representação esquemática da ativação das plaquetas pelo colágeno, pela trombina, pelo tromboxano A_2 e pelo ADP e sua inibição pela prostaciclina. O ambiente externo, a membrana plasmática e o interior da plaqueta estão ilustrados de cima para baixo. As respostas plaquetárias incluem, dependendo do agonista, mudança no formato da plaqueta, liberação do conteúdo dos grânulos de armazenamento e agregação.(AC, adenilil-ciclase; AMPc, AMP cíclico; COX-1, ciclo-oxigenase-1; fosfolipase A_2 citosólica; DAG, 1,2-diacilglicerol; GP, glicoproteína; IP, receptor de prostaciclina; IP_3, inositol-1,4,5-trisfosfato; $P2Y_1$, $P2Y_{12}$, receptores de purina; PAR, receptor ativado por protease; PIP_2, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato; PKC, proteinoquinase C; PL, fosfolipídeo; PLCβ, fosfolipase Cβ; PLCγ, fosfolipase Cγ; TP, receptor de tromboxano A_2; TxA_2, tromboxano A_2; VWF, fator de von Willebrand.) As proteínas G envolvidas não estão ilustradas. **(B) Representação esquemática da agregação plaquetária mediada pela ligação do fibrinogênio a moléculas ativadas de GPIIb-IIIa presentes nas plaquetas adjacentes.** Os eventos de sinalização iniciados por todos os agentes agregadores transformam a GPIIb-IIIa de seu estado de repouso em uma forma ativada, que pode ligar-se ao fibrinogênio divalente ou ao fator de von Willebrand multivalente na presença do alto cisalhamento que ocorre nos pequenos vasos.

mente usado é o **ácido acetilsalicílico** (aspirina), que acetila irreversivelmente e, portanto, inibe o sistema da ciclo-oxigenase (COX-1) das plaquetas envolvido na formação do tromboxano A_2 (Capítulo 15), um poderoso agregador das plaquetas, bem como um vasoconstritor. As plaquetas são muito sensíveis ao ácido acetilsalicílico, e o uso de apenas 30 mg/dia (um comprimido de ácido acetilsalicílico contém geralmente 325 mg) impede efetivamente a síntese de tromboxano A_2. O ácido acetilsalicílico também inibe a produção de prostaciclina (PGI_2, que se opõe à agregação plaquetária e que atua como vasodilatador) pelas células endoteliais; todavia, diferentemente das plaquetas, essas células regeneram a ciclo-oxigenase dentro de poucas horas. Desse modo, o equilíbrio

TABELA 51-3 Moléculas sintetizadas pelas células endoteliais que desempenham um papel na regulação da trombose e da fibrinólise

Molécula	Ação
ADPase (CD39, uma ectoenzima	Degrada o ADP (um agente agregador das plaquetas) em AMP + Pi
Óxido nítrico (NO)	Inibe a adesão e a agregação das plaquetas por meio da elevação dos níveis de GMPc
Prostaciclina (PGI_2, uma prostaglandina)	Inibe a agregação plaquetária pela elevação dos níveis de AMPc
Trombomodulina (uma glicoproteína)	Liga-se à trombina que, a seguir, cliva a proteína C, produzindo a proteína C ativada; esta última, em associação com a proteína S, degrada os fatores Va e VIIIa, limitando suas ações
Receptor da proteína C endotelial (t-PA, uma glicoproteína)	Facilita a ativação da proteína C pelo complexo de trombina-trombomodulina
Ativador do plasminogênio tecidual (t-PA, uma protease)	Ativa o plasminogênio à plasmina, que digere a fibrina; a ação do t-PA opõe-se ao inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1)

Fonte: Adaptada, com autorização, de Wu KK: Endothelial cells in hemostasis, thrombosis and inflammation. Hosp Pract (Off Ed) 1992;27:145.

global entre o tromboxano A_2 e a prostaciclina pode ser deslocado em favor da prostaciclina, opondo-se à agregação plaquetária. As indicações para o tratamento com ácido acetilsalicílico incluem o tratamento das síndromes coronárias agudas (angina, infarto do miocárdio), das síndromes de acidente vascular encefálico agudo (ataques sistêmicos transitórios, acidente vascular encefálico agudo), estenose grave da artéria carótida e prevenção primária destas, bem como de outras doenças aterotrombóticas.

Outros fármacos antiplaquetários incluem o clopidogrel, um inibidor específico do receptor $P2Y_{12}$ para o ADP, e antagonistas da ligação do ligante à GPIIb-IIIa (p. ex., abciximabe), que interferem na ligação do fibrinogênio e do fator de von Willebrand e, portanto, da agregação plaquetária.

A coagulação, a trombólise e a agregação plaquetária são medidas por testes de laboratório

Existem vários **exames laboratoriais** para medir as fases da hemostasia descritas anteriormente. Esses exames incluem a contagem de plaquetas, o tempo de oclusão com tampão plaquetário, a agregação plaquetária, o tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT ou PTT), o tempo de protrombina (PT), o tempo de trombina (TT), as concentrações de fibrinogênio, a estabilidade do coágulo de fibrina e a determinação dos produtos de degradação da fibrina. A **contagem de plaquetas** quantifica o número de plaquetas. O **tempo de sangramento** é um exame global de função das plaquetas e da parede vascular, enquanto o **tempo de oclusão**, medido com um analisador da função plaquetária PFA-100, é um teste *in vitro* de hemostasia relacionada com as plaquetas. A **agregação plaquetária** mede a resposta a agentes agregadores específicos. O aPTT fornece uma avaliação da via intrínseca, enquanto o **PT** é uma medida da via extrínseca, sendo o aPPT usado para monitorar a heparinoterapia e PT, para determinar a eficiência de anticoagulantes orais, como a varfarina. O leitor deve consultar um livro de hematologia para uma descrição desses testes.

RESUMO

- A hemostasia e a trombose são processos complexos que envolvem os fatores da coagulação, as plaquetas e os vasos sanguíneos.
- Muitos fatores da coagulação são zimogênios de serina proteases que são ativados e, em seguida, inativados durante o processo global.
- Há uma via extrínseca e uma via intrínseca da coagulação, sendo a primeira iniciada *in vivo* pelo fator tecidual. As vias convergem para o fator Xa, resultando na conversão, catalisada pela trombina, do fibrinogênio em fibrina, que é fortalecida por ligações cruzadas covalentes, em um processo catalisado pelo fator XIIIa.
- Ocorrem distúrbios genéticos que causam sangramento; os principais envolvem o fator VIII (hemofilia A), o fator IX (hemofilia B) e o fator de von Willebrand (doença de von Willebrand).
- A antitrombina é um importante inibidor natural da coagulação; a deficiência genética dessa proteína pode resultar em trombose.
- Para a sua atividade, os fatores II, VII, IX e X e as proteínas C e S exigem a γ-carboxilação dependente de vitamina K de determinados resíduos de glutamato, em um processo que é inibido pelo anticoagulante varfarina.
- A fibrina é dissolvida pela plasmina. A plasmina ocorre como precursor inativo, o plasminogênio, que pode ser ativado pelo ativador do plasminogênio tecidual (t-PA). Tanto o t-PA quanto a estreptoquinase são amplamente utilizados no tratamento da trombose inicial das artérias coronárias.
- A trombina e outros agentes provocam agregação plaquetária, que envolve uma variedade de eventos bioquímicos e morfológicos. A estimulação da fosfolipase C e da via do polifosfoinositídeo constitui um evento essencial na ativação das plaquetas, embora outros processos também estejam envolvidos.
- O ácido acetilsalicílico é um fármaco antiplaquetário importante que atua ao inibir a produção de tromboxano A_2.

REFERÊNCIAS

Colman RW, Marder VJ, Clowes AW, et al (editors): *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, et al: *Harrison's Principles of Internal Medicine,* 17th ed. McGraw-Hill, 2008.

Hoffman R, Benz Jr EJ, Shattil SJ, et al (editors): *Hematology: Basic Principles and Practice,* 4th ed. Elsevier Churchill Livingston, 2005.

Israels SJ (editor): *Mechanisms in Hematology,* 4th ed. Core Health Sciences Inc, 2011. (This text has many excellent illustrations of basic mechanisms in hematology.)

Michelson AD (editor): *Platelets*, 2nd ed. Elsevier, 2007.

CAPÍTULO

52

Eritrócitos e Leucócitos

Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Compreender o conceito de células-tronco e sua importância.
- Resumir as causas dos principais distúrbios que acometem os eritrócitos.
- Discutir a estrutura geral da membrana eritrocitária.
- Conhecer as bases bioquímicas das substâncias do grupo sanguíneo ABO.
- Indicar as principais características bioquímicas dos neutrófilos e compreender a base da doença granulomatosa crônica.
- Reconhecer a importância das integrinas na saúde e na doença.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

As células sanguíneas têm sido extensamente estudadas em virtude de sua fácil obtenção, importância funcional e participação em muitos processos patológicos. A estrutura e a função da **hemoglobina**, das **porfirias**, da **icterícia** e dos aspectos do **metabolismo do ferro** são discutidas em capítulos anteriores. A **Tabela 52-1** fornece um resumo das etiologias de várias doenças importantes que afetam os eritrócitos; algumas delas são descritas neste capítulo, e as demais são discutidas em outras seções do livro. A **anemia** é uma condição muito prevalente que apresenta muitas etiologias. A **descoberta das causas de certos tipos de anemias** (p. ex., da anemia perniciosa [uma forma de anemia por deficiência da vitamina B_{12}] e da anemia falciforme) tem sido uma área onde a relação recíproca entre a medicina e a bioquímica, mencionada no Capítulo 1, foi extremamente benéfica. A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a **anemia** como um nível de hemoglobina de $<$130 g/L nos homens e de $<$120 g/L nas mulheres. A anemia tem muitas causas, porém apenas as mais prevalentes ou bioquimicamente relevantes são mencionadas neste capítulo. A **Tabela 52-2** fornece uma classificação simplificada das causas de anemia. Foi estimado que, a cada ano, cerca de 300.000 crianças nascem com um grave distúrbio hereditário da hemoglobina, sendo a maioria dos casos observada em países de baixa ou média renda. Como a mortalidade infantil está diminuindo, muitas dessas crianças irão sobreviver, representando um problema de saúde global. Determinados **sistemas de grupos sanguíneos**, presentes na membrana dos eritrócitos e de outras células sanguíneas, são de suma importância na transfusão sanguínea e no transplante de tecidos. Qualquer órgão do corpo pode ser afetado por **inflamação**; os neutrófilos desempenham um papel central na inflamação aguda, enquanto outros leucócitos, como os linfócitos, exercem funções importantes na inflamação crônica. As **leucemias**, definidas como neoplasias malignas dos tecidos hematopoiéticos, podem acometer as células precursoras de qualquer uma das principais classes de leucócitos; os tipos comuns consistem nas leucemias mielocíticas aguda e crônica, que acometem as células precursoras dos neutrófilos, e as leucemias linfocíticas aguda e crônica. O conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na etiologia das leucemias está aumentando rapidamente, porém não é discutido detalhadamente neste capítulo. A poliquimioterapia, que utiliza combinações de vários agentes quimioterápicos, os quais atuam em um ou mais processos bioquímicos, tem sido notavelmente efetiva no tratamento de alguns desses tipos de leucemia. A compreensão dos papéis desempenhados pelos eritrócitos e pelos leucócitos na saúde e na doença exige um conhecimento de alguns aspectos fundamentais de sua bioquímica.

TODAS AS CÉLULAS SANGUÍNEAS ORIGINAM-SE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

A **Figura 52-1** fornece um resumo da origem dos vários tipos de células sanguíneas a partir das **células-tronco hematopoiéticas**. A primeira evidência sólida sobre a existência de células-tronco e, em particular, de células-tronco hematopoiéticas, foi obtida de estudos realizados em camundongos por Ernest McCulloch e James Till, em 1963. Nos últimos anos, o interesse pelas células-

TABELA 52-1 Resumo das causas de alguns distúrbios importantes que afetam os eritrócitos

Distúrbio	Causa principal ou única
Anemia ferropriva	Ingestão inadequada ou perda excessiva de ferro
Metemoglobinemia	Ingestão excessiva de oxidantes (várias substâncias químicas e fármacos) Deficiência genética do sistema de metemoglobina redutase dependente de NADH (OMIM 250800) Herança de HbM (OMIM 141900)
Anemia falciforme (OMIM 603903)	Sequência do códon 6 da cadeia β alterada de GAG no gene normal para GTG no gene da célula falciforme, resultando em substituição do ácido glutâmico por valina.
α-Talassemias (OMIM 141800)	Mutações dos genes da α-globina, principalmente *crossing-over* desigual e grandes deleções e, com menos frequência, mutações sem sentido e de fase de leitura
β-Talassemias (OMIM 141900)	Uma ampla variedade de mutações do gene da β-globina, incluindo deleções, mutações sem sentido e de fase de leitura e outras afetando qualquer aspecto de sua estrutura (p. ex., locais de *splicing*, mutantes promotores)
Anemias megaloblásticas	
Deficiência de vitamina B_{12}	Diminuição da absorção de vitamina B_{12}, frequentemente devido a uma deficiência do fator intrínseco, que é secretado normalmente pelas células parietais do estômago
Deficiência de ácido fólico	Ingestão diminuída, absorção deficiente ou aumento das demandas (p. ex., durante a gravidez) de folato
Esferocitose hereditária[1] (OMIM 182900)	Deficiências na quantidade ou na estrutura da espectrina α ou β, anquirina, banda 3 ou banda 4.1
Deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD)[1] (OMIM 305900)	Diversas mutações do gene (ligado ao X) da G6PD, principalmente mutações pontuais isoladas
Deficiência de piruvato-quinase (PK)[1] (OMIM 266200)	Várias mutações do gene que codifica a isozima R (eritrócito) da PK
Hemoglobinúria paroxística noturna[1] (OMIM 311770)	Mutações do gene PIG-A, afetando a síntese de proteínas ancoradas ao GPI

[1]Os últimos quatro distúrbios causam anemias hemolíticas, assim como vários outros distúrbios citados. As condições listadas acima são, em sua maior parte, discutidas em outros capítulos deste livro. Os números OMIM referem-se apenas aos distúrbios com base genética.

TABELA 52-2 Classificação sucinta das causas de anemia

A.	Perda de sangue: aguda, crônica	
B.	Deficiências que causam defeitos da eritropoiese (p. ex., ferro, folato, vitamina B_{12} e outros fatores)	
C.	Hemólise:	i. Devido a fatores extrínsecos: por exemplo, vários anticorpos, hemolisinas, venenos de serpentes, etc. ii. Devido a fatores intrínsecos: Mutações dos genes que codificam as proteínas da membrana eritrocitária (p. ex., esferocitose hereditária e eliptocitose hereditária) Enzimopatias dos eritrócitos (p. ex., glicose-6-fosfato-desidrogenase, piruvato-quinase e outras) Hemoglobinopatias (particularmente a HbS) e talassemias, infecções parasitárias (p. ex., plasmódios na malária)

Nota: A Figura 52-3 também indica as causas das anemias hemolíticas. Na anemia, os eritrócitos podem ser **maiores** do que o normal (macrócitos, conforme observado nas deficiências de folato e de vitamina B12), de **tamanho normal** (normócitos, como os que ocorrem na perda aguda de sangue ou na insuficiência medular) ou **menores** do que o normal (microcítos, conforme observado na anemia ferropriva). Além disso, podem apresentar **coloração** mais intensa do que a habitual (hipercrômicos), normal (normocrômicos) ou mais pálida do que a habitual (hipocrômicos). Essas diferenças na intensidade de sua coloração refletem qualitativamente um conteúdo de hemoglobina maior, normal ou menor.

-tronco aumentou significativamente, e, hoje, essas células são importantes em quase todas as áreas da medicina e das ciências da saúde. Uma célula-tronco é uma célula com capacidade singular de produzir filhas inalteradas (i.e., **autorrenovação**) e gerar tipos de células especializadas (**potência**). As células-tronco podem ser **totipotentes** (com capacidade de produzir todas as células de um organismo), **pluripotentes** (com capacidade de se diferenciar em células de qualquer uma das três camadas germinativas), **multipotentes** (que produzem apenas células de uma família estreitamente relacionada) ou **unipotentes** (que só produzem um tipo de célula). As células-tronco também são classificadas em células **embrionárias** e **do adulto**; estas últimas são mais limitadas na sua capacidade de diferenciação do que as embrionárias, embora abordagens genéticas para superar essa restrição estejam se tornando disponíveis.

Conforme ilustrado na Figura 52-1, os **eritrócitos** e as **plaquetas** compartilham uma via comum de diferenciação até o estágio de progenitores eritroides megacariocíticos. As células de **origem linfoide** bifurcam-se no estágio de progenitores multipotentes, enquanto os **outros leucócitos** o fazem no estágio de progenitores mieloides comuns. Cada uma das vias é **regulada** por diversos fatores (p. ex., fator da célula-tronco, trombopoietina, várias interleucinas, eritropoietina, etc), e **fatores de transcrição** específicos e essenciais (não indicados na figura) também estão envolvidos nos estágios indicados.

O **fator das células-tronco** é uma citocina que desempenha um papel importante na proliferação das células-tronco hematopoiéticas e algumas de sua progênie. A **trombopoetina** é uma glicoproteína importante na regulação da produção de plaquetas pela medula óssea. As **interleucinas** são citocinas produzidas pelos leucócitos, que regulam vários aspectos da hematopoiese e do sistema imune.

O ERITRÓCITO É UMA CÉLULA SIMPLES NA SUA ESTRUTURA E FUNÇÃO

As **principais funções dos eritrócitos** são relativamente simples e consistem em fornecer oxigênio aos tecidos e facilitar a eliminação do dióxido de carbono e dos prótons gerados pelo metabolismo tecidual. Por conseguinte, os eritrócitos possuem uma estrutura muito mais simples do que a maioria das células humanas e são

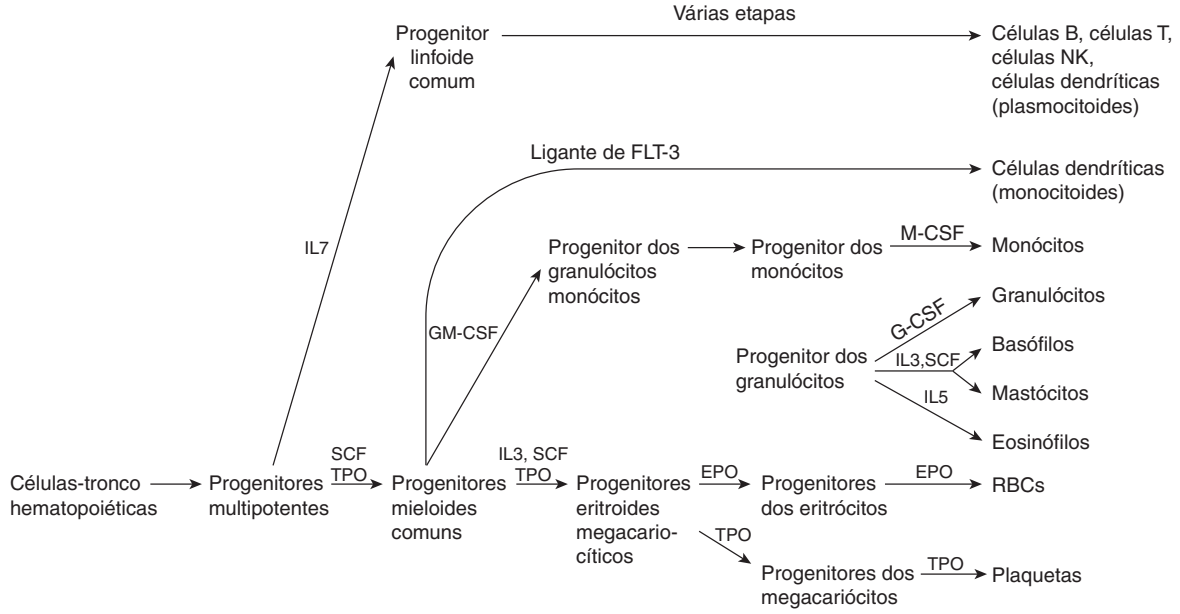


FIGURA 52-1 Esquema simplificado de diferenciação dos eritrócitos e de outras células sanguíneas a partir da célula-tronco hematopoiética. A figura mostra os locais de ação das interleucinas (IL-7, IL-3 e IL-5), do fator de células-tronco (SCF), da trombopoietina (TPO), do ligante de FLT-3 (um fator de crescimento), do fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), da eritropoietina (EPO), do fator estimulador de colônias de monócitos (M-CSF) e fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF). Os locais de ação de fatores importantes da transcrição não estão indicados. Várias etapas no desenvolvimento das células linfoides (parte superior da figura) foram omitidas e abreviadas em uma única etapa. (Modificada, com autorização, de Scadden DT, Longo DL in Fauci AS et al. (editors), *Harrison's Principles of Internal Medicine,* 17th ed. McGraw-Hill, 2008. Capítulo 68.)

compostos, essencialmente, por uma membrana que circunda uma solução de hemoglobina (essa proteína constitui cerca de 95% das proteínas intracelulares do eritrócito). Não há organelas intracelulares, como mitocôndrias, lisossomos ou aparelho de Golgi. Os eritrócitos humanos, à semelhança da maioria dos eritrócitos dos animais, são células anucleadas. Entretanto, o eritrócito não é metabolicamente inativo. O **ATP** é sintetizado por meio da **glicólise** e é importante nos processos que ajudam o eritrócito a manter a sua forma de disco bicôncavo, bem como na regulação do **transporte de íons** (p. ex., pela Na^+-K^+-ATPase e pela proteína trocadora de ânions [ver adiante]) e da passagem de **água** para dentro e para fora da célula. O formato bicôncavo aumenta a razão entre superfície e volume do eritrócito, facilitando, assim, a troca gasosa. Os eritrócitos contêm componentes citoesqueléticos (ver adiante), que desempenham um papel importante na determinação de sua morfologia.

Cerca de dois milhões de eritrócitos entram na circulação por segundo

O **tempo de vida** do eritrócito normal é de 120 dias; isso significa que ligeiramente menos de 1% da população de eritrócitos (~200 bilhões de células) é substituído diariamente (ou seja, ~2 milhões por segundo). Os novos eritrócitos que aparecem na circulação ainda contêm ribossomos e elementos do retículo endoplasmático. O RNA dos ribossomos pode ser detectado por corantes apropriados (como o azul de cresil), e as células que os contêm são denominadas reticulócitos; geralmente, representam cerca de 1% da contagem total de eritrócitos. O tempo de sobrevida do eritrócito pode ser drasticamente abreviado em uma variedade de **anemias hemolíticas**. A contagem de reticulócitos aumenta acentuadamente nesses distúrbios, visto que a medula óssea procura compensar a rápida destruição dos eritrócitos com um aumento na quantidade de novas células jovens na circulação.

A eritropoietina regula a produção dos eritrócitos

A **eritropoietina** (**EPO**) humana é uma glicoproteína de 166 aminoácidos (massa molecular de cerca de 34 kDa). A sua quantidade no plasma pode ser medida por radioimunoensaio. A eritropoietina constitui o principal regulador da eritropoiese humana (Figura 52-1). Conforme ilustrado na figura, os estágios iniciais no desenvolvimento dos eritrócitos envolvem o fator de células-tronco, a trombopoietina e a interleucina-3. A EPO é sintetizada principalmente pelos rins e liberada em resposta à hipoxia na corrente sanguínea, a partir da qual é transportada até a medula óssea. Na medula óssea, a eritropoietina interage com progenitores dos eritrócitos por meio de um **receptor específico**. Esse receptor é uma proteína transmembrana, que consiste em duas subunidades diferentes e alguns domínios. Essa proteína não é uma tirosina quinase, porém ela estimula as atividades de membros específicos dessa classe de enzimas envolvidas na transdução distal de sinais.

A disponibilidade de um **cDNA para EPO** possibilitou a produção de quantidades substanciais desse hormônio para análise e para fins terapêuticos. Anteriormente, o isolamento da eritropoietina da urina humana fornecia quantidades muito pequenas da proteína. A principal aplicação da **EPO recombinante** tem sido no tratamento de um pequeno número de **estados anêmicos**, como aqueles causados por insuficiência renal. Conforme descrito no Capítulo 47, foram feitas tentativas para prolongar a

meia-vida da EPO (prolongando, assim, a sua atividade) na circulação ao alterar a natureza de suas cadeias de açúcar.

MUITOS FATORES DE CRESCIMENTO REGULAM A PRODUÇÃO DOS LEUCÓCITOS

Recentemente, além da eritropoietina, foram identificados numerosos **fatores de crescimento hematopoiéticos**. Esse campo de estudos amplia os conhecimentos sobre a diferenciação das células sanguíneas, fornece fatores que podem ter utilidade terapêutica e também tem implicações na compreensão do crescimento anormal das células sanguíneas (p. ex., nas leucemias). À semelhança da eritropoietina, os fatores de crescimento isolados têm sido, em sua maioria, glicoproteínas, que são muito ativas *in vivo* e que interagem *in vitro* com suas células-alvo por meio de receptores específicos de superfície celular e, por fim (por meio de sinais intracelulares), afetam a expressão genética, promovendo, assim, a diferenciação. Muitos desses fatores foram clonados, possibilitando a sua produção em quantidades relativamente grandes. Dois desses fatores de interesse particular são os **fatores estimuladores de colônias de granulócitos** e **de colônias de granulócitos-macrófagos** (G-CSF e GM-CSF, respectivamente). Conforme ilustrado na Figura 52-1, o G-CSF é relativamente específico, induzindo principalmente os granulócitos, enquanto o GM-CSF induz uma maior variedade de leucócitos. Quando a produção de neutrófilos está gravemente diminuída, o distúrbio é designado como **neutropenia**. A neutropenia tende a ocorrer particularmente em pacientes tratados com determinados esquemas quimioterápicos, bem como após transplante de medula óssea. Esses pacientes são passíveis a desenvolver infecções maciças. O G-CSF tem sido administrado nesses casos para estimular a produção de neutrófilos.

O ERITRÓCITO TEM UM METABOLISMO SINGULAR E RELATIVAMENTE SIMPLES

A **Tabela 52-3** fornece um resumo de vários aspectos do **metabolismo dos eritrócitos**, muitos dos quais são discutidos em outros capítulos.

TABELA 52-3 Resumo dos aspectos importantes do metabolismo dos eritrócitos

- O eritrócito é altamente dependente da glicose como fonte de energia; sua membrana contém transportadores de glicose de alta afinidade.
- A glicólise, que produz lactato, constitui o local de produção de ATP.
- Devido à ausência de mitocôndrias nos eritrócitos, não há produção de ATP por fosforilação oxidativa.
- O eritrócito possui uma variedade de transportadores que mantêm o equilíbrio iônico e hídrico.
- A produção de 2,3-bifosfoglicerato por reações estreitamente associadas à glicólise é importante na regulação da capacidade de transporte do oxigênio pela Hb.
- A via das pentoses-fosfato atua nos eritrócitos (essa via metaboliza cerca de 5 a 10% do fluxo total de glicose) e produz NADPH; é comum a ocorrência de anemia hemolítica devido a uma deficiência da atividade da glicose-6-fosfato-desidrogenase.
- A glutationa reduzida (GSH) é importante no metabolismo dos eritrócitos, em parte para contrabalançar a ação dos peróxidos potencialmente tóxicos; o eritrócito pode sintetizar GSH e exige a presença do NADPH para converter a glutationa oxidada (G-S-S-G) de volta a seu estado reduzido.
- O ferro da Hb precisa ser mantido no estado ferroso; o íon férrico é reduzido ao estado ferroso pela ação de um sistema de metemoglobina redutase dependente de NADH, envolvendo a citocromo b_5 redutase e o citocromo b_5.
- Não ocorre síntese de glicogênio, ácidos graxos, proteínas e ácidos nucleicos no eritrócito; todavia, alguns lipídeos (p. ex., o colesterol) na membrana eritrocitária podem ser permutados com lipídeos plasmáticos correspondentes.
- O eritrócito contém algumas enzimas do metabolismo dos nucleotídeos (p. ex., adenosina desaminase, pirimidina nucleotidase e adenilil-quinase); as deficiências dessas enzimas estão envolvidas em alguns casos de anemia hemolítica.
- Quando os eritrócitos chegam ao final de seu tempo de sobrevida, a globina sofre degradação em aminoácidos (que são novamente utilizados pelo organismo), o ferro é liberado do heme e também é reaproveitado, e o componente tetrapirrólico do heme é convertido em bilirrubina, a qual é excretada principalmente no intestino por meio da bile.

O eritrócito possui um transportador de glicose em sua membrana

A taxa de entrada da glicose nos eritrócitos é muito mais rápida do que se poderia prever com base no processo de difusão simples. Na verdade, trata-se de um exemplo de **difusão facilitada** (Capítulo 40). A proteína específica envolvida nesse processo é denominada **transportador de glicose** (GLUT1) ou glicose permease. Algumas de suas propriedades estão resumidas na **Tabela 52-4**. O processo de entrada da glicose nos eritrócitos é de suma importância, já que a glicose constitui a principal fonte de combustível dessas células. Foram isolados cerca de 12 transportadores de glicose diferentes, porém relacionados, de vários tecidos humanos; diferentemente do transportador dos eritrócitos, alguns desses transportadores de glicose são dependentes de insulina (p. ex., no músculo e no tecido adiposo). Existe um considerável interesse nesses últimos tipos de transportadores, pois a ocorrência de defeitos no seu recrutamento dos locais intracelulares para a superfície das células do músculo esquelético pode ajudar a explicar a **resistência à insulina** apresentada por pacientes com diabetes melito tipo 2.

Os reticulócitos são ativos na síntese de proteínas

O eritrócito maduro é incapaz de sintetizar proteínas. Os reticulócitos são ativos na síntese de proteínas, e quando entram na circulação, eles perdem suas organelas intracelulares (ribossomos, mitocôndrias, etc.) dentro de 24 h, transformando-se em eritrócitos jovens e perdendo concomitantemente a sua capacidade de sintetizar proteínas. Extratos de reticulócitos de coelho (obtidos pela injeção, em coelhos, de uma substância química – a fenil-hidrazina –, que provoca anemia hemolítica severa, de modo que os eritróci-

TABELA 52-4 Algumas propriedades do transportador de glicose da membrana do eritrócito (GLUT1)

- Constitui ~2% das proteínas da membrana do eritrócito.
- Exibe especificidade pela glicose e pelas D-hexoses relacionadas (as L-hexoses não são transportadas).
- O transportador funciona em ~75% de seu $V_{máx}$ na concentração fisiológica de glicemia, é saturável e pode ser inibido por determinados análogos da glicose.
- Até o momento, foram detectados cerca de 12 transportadores de glicose semelhantes, porém distintos, nos tecidos dos mamíferos, entre os quais o transportador da membrana eritrocitária é um deles.
- O transportador não é dependente de insulina, diferentemente do carreador correspondente presente no músculo e no tecido adiposo.
- A sequência completa de aminoácidos (492 aminoácidos) foi determinada.
- Ele transporta glicose quando inserido em lipossomos artificiais.
- Estima-se que o transportador contenha 12 segmentos helicoidais transmembrana.
- O transportador atua gerando um poro regulado na membrana para possibilitar a passagem da glicose; a conformação do poro depende da presença de glicose e pode oscilar rapidamente (~900 vezes/s).

tos são quase totalmente substituídos por reticulócitos) são amplamente usados como sistema in vitro para a síntese de proteínas. Os mRNAs endógenos presentes nesses reticulócitos são destruídos pela aplicação de uma nuclease, cuja atividade pode ser inibida pelo acréscimo de Ca^{2+}. Em seguida, o sistema é programado pela adição de mRNAs purificado ou por extratos de mRNA de células intactas, e as proteínas radioativas são sintetizadas na presença de L-metionina marcada com S35 ou outros aminoácidos marcados radiativamente. As proteínas radioativas sintetizadas são separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e detectadas por radioautografia.

No que diz respeito à **síntese de proteínas**, é interessante assinalar que determinados distúrbios causados por anormalidades genéticas provocam comprometimento na estrutura e função dos ribossomos e foram designados como **ribossomopatias**. Esses distúrbios incluem alguns casos de **anemia de Diamond-Blackfan**, em que mutações de um gene de processamento do RNA ribossômico (RPS19) resultam em hipoplasia dos eritrócitos. A **síndrome 5q** apresenta um quadro clínico semelhante e é causada por uma insuficiência da proteína ribossômica RPS 14.

A superóxido dismutase, a catalase e a glutationa protegem os eritrócitos do estresse e dano oxidativos

Vários **oxidantes** potentes são produzidos durante o metabolismo, tanto nos eritrócitos quanto na maioria das outras células do corpo. Esses oxidantes incluem o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais peroxila ($ROO^{\bullet}$) e radicais hidroxila ($OH^{\bullet}$), que são designados como **espécies reativas do oxigênio** (**ROS**). Os **radicais livres** são átomos ou grupos de átomos que apresentam um elétron não pareado (ver os Capítulos 15 e 45). O radical $OH^{\bullet}$ é uma molécula particularmente reativa que pode reagir com proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos e outras moléculas, alterando a sua estrutura e produzindo lesão tecidual. As reações listadas na **Tabela 52-5** desempenham um papel importante na formação desses oxidantes e na sua eliminação; a seguir, cada uma dessas reações será considerada individualmente.

O **superóxido** é formado (reação 1) nos eritrócitos por auto-oxidação da hemoglobina em metemoglobina (foi calculado que aproximadamente 3% da hemoglobina nos eritrócitos humanos sofrem auto-oxidação por dia); nos outros tecidos, esse radical é produzido pela ação de enzimas como a citocromo P450 redutase e a xantina oxidase. Quando estimulados pelo contato com bactérias, os **neutrófilos** exibem uma **explosão respiratória** (ver adiante) e geram superóxido, em uma reação catalisada pela NADPH oxidase (reação 2). O superóxido sofre dismutação espontânea e forma H_2O_2 e O_2; entretanto, a taxa dessa mesma reação é acentuadamente acelerada pela ação da enzima **superóxido dismutase** (reação 3). O **peróxido de hidrogênio** tem vários destinos. A enzima **catalase**, presente em muitos tipos de células, o converte em H_2O e O_2 (reação 4). Os neutrófilos têm uma enzima singular, a **mieloperoxidase**, que utiliza o H_2O_2 e haletos para produzir ácidos hipoalosos (reação 5); esse assunto é discutido adiante, de modo mais pormenorizado. A enzima **glutationa peroxidase**, que contém selênio (Capítulo 21), também atua sobre a glutationa reduzida (GSH) e sobre o H_2O_2, produzindo glutationa oxidada (GSSG) e H_2O (reação 6); essa enzima também pode utilizar outros peróxidos como substrato. Os radicais $OH^{\bullet}$ e OH^- podem ser formados a partir do H_2O_2, em uma reação não enzi-

TABELA 52-5 Reações importantes em relação ao estresse oxidativo nos eritrócitos e em vários tecidos

1.	Produção de superóxido (subproduto de várias reações)	$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$
2.	NADPH oxidase	$2\,O_2 + NADPH \rightarrow 2\,O_2^{\cdot-} + NADP + H^+$
3.	Superóxido dismutase	$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2\,H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
4.	Catalase	$H_2O_2 \rightarrow 2\,H_2O + O_2$
5.	Mieloperoxidase	$H_2O_2 + X^- + H^+ \rightarrow HOX + H_2O$ ($X^- = Cl^-, Br^-, SCN^-$)
6.	Glutationa peroxidase (dependente de Se)	$2\,GSH + R\text{-}O\text{-}OH \rightarrow GSSG + H_2O + ROH$
7.	Reação de Fenton	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^-$
8.	Reação de Haber-Weiss catalisada pelo ferro	$O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^{\bullet} + OH^-$
9.	Glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD)	$G6P + NADP \rightarrow 6\text{-Fosfogliconato} + NADPH + H^+$
10.	Glutationa redutase	$G\text{-}S\text{-}S\text{-}G + NA \rightarrow DPH + H^+ \rightarrow 2\,GSH + NADP$

mática catalisada pelo Fe^{2+} (a **reação de Fenton,** reação 7). O $O_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 são os substratos da **reação de Haber-Weiss** (reação 8) catalisada pelo ferro, que também produz $OH^{\cdot}$ e OH^-. O superóxido pode liberar íons ferro a partir da ferritina. Assim, a produção do radical pode constituir um dos mecanismos envolvidos na lesão tecidual causada pela sobrecarga de ferro na hemocromatose (ver Caso nº 10, Capítulo 57).

Os compostos químicos e as reações capazes de gerar espécies potencialmente tóxicas de oxigênio podem ser designados como **pró-oxidantes**. Por outro lado, os compostos e as reações que atuam nessas espécies, as eliminam, suprimem a sua formação ou se contrapõem às suas ações são conhecidos como **antioxidantes** e incluem compostos como o NADPH, a GSH, o ácido ascórbico e a vitamina E. Na célula normal, existe um equilíbrio apropriado entre pró-oxidantes e antioxidantes. Entretanto, esse equilíbrio pode ser alterado a favor dos pró-oxidantes quando a produção de espécies de oxigênio aumenta acentuadamente (p. ex., após a ingestão de certas substâncias químicas ou fármacos), ou quando os níveis de antioxidantes estão diminuídos (p. ex., por inativação das enzimas envolvidas na eliminação das espécies de oxigênio e por condições que provocam baixos níveis dos antioxidantes citados anteriormente). Esse estado, que é denominado "**estresse oxidativo**" (ver Capítulo 45), pode resultar em grave dano celular se o estresse for intenso ou prolongado.

Atualmente, acredita-se que as ROS desempenham um papel importante em muitos tipos de **dano celular** (p. ex., em consequência da administração de várias substâncias químicas tóxicas ou de isquemia), dos quais alguns podem levar à morte. São obtidas evidências indiretas que sustentam a atuação dessas espécies na produção de dano celular quando a administração de uma enzima, como a superóxido dismutase ou a catalase, protege contra a ocorrência de dano celular na situação específica estudada.

A deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase é frequente em certas regiões e constitui uma causa importante de anemia hemolítica

O **NADPH**, que é produzido na reação catalisada pela glicose-6-fosfato-desidrogenase ligada ao X (Tabela 52-5, reação 9) na **via das pentoses-fosfato** (Capítulo 21), desempenha um papel essencial na geração de equivalentes redutores nos eritrócitos e em outras células, como o hepatócito. Como a via das pentoses-fosfato constitui praticamente a única maneira de produzir NADPH, o eritrócito é muito sensível ao dano oxidativo se a função dessa via estiver comprometida (p. ex., por deficiência enzimática). Uma das funções do NADPH consiste em reduzir a GSSG em GSH, em uma reação catalisada pela glutationa redutase (reação 10).

A deficiência da atividade da **glicose-6-fosfato-desidrogenase**, causada por mutação, é extremamente frequente em algumas regiões do mundo (p. ex., África tropical, Mediterrâneo, determinadas partes da Ásia e na América do Norte, entre os negros). É a mais comum de todas as **enzimopatias** (doenças causadas por anormalidades das enzimas), e foram identificadas cerca de 140 variantes genéticas da enzima; segundo estimativas, pelo menos 400 milhões de pessoas apresentam um gene variante. Acredita-se que uma forma anormal dessa enzima possa conferir resistência à malária. O distúrbio resultante da deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase é a **anemia hemolítica**. Quando uma forma anormal de uma enzima causa patologia, é designada como **enzimopatia**. O consumo de **feijão fava** (*Vicia faba*) por indivíduos com deficiência na atividade dessa enzima pode precipitar um episódio agudo de anemia hemolítica, visto que esses feijões contêm oxidantes potenciais. Além disso, diversos fármacos (p. ex., o agente antimalárico **primaquina** [o distúrbio causado pela administração de primaquina é denominado **anemia hemolítica sensível à primarquina**] e **sulfonamidas**) e substâncias químicas (p. ex., naftaleno) precipitam uma crise, pois a sua ingestão leva à geração de H_2O_2 ou $O_2^{\cdot-}$. Normalmente, o H_2O_2 é eliminado pela **catalase** e pela **glutationa peroxidase** (Tabela 52-5, reações 4 e 6), e esta última resulta em aumento na produção de GSSG. A GSH é regenerada a partir da GSSG pela ação da enzima **glutationa redutase**, que depende da disponibilidade de NADPH (reação 10). Os eritrócitos de indivíduos com deficiência na atividade da glicose-6-fosfato-desidrogenase são incapazes de produzir quantidades suficientes de NADPH para regenerar a GSH a partir da GSSG, que, por sua vez, interfere na capacidade de eliminar o H_2O_2 e os radicais de oxigênio. Esses compostos podem provocar a oxidação de grupos SH críticos nas proteínas e, possivelmente, a peroxidação dos lipídeos na membrana do eritrócito, causando lise da membrana eritrocitária. Alguns dos grupos SH da hemoglobina são oxidados, e a proteína precipita dentro do eritrócito, formando **corpúsculos de Heinz**, que se coram de roxo com violeta de cresil. A presença de corpúsculos de Heinz indica que os eritrócitos sofreram estresse oxidativo. A **Figura 52-2** fornece um resumo da possível cadeia de eventos na anemia hemolítica causada pela deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase.

As anemias hemolíticas são causadas por anormalidades fora ou dentro da membrana do eritrócito

A **Figura 52-3** fornece um resumo de várias causas das anemias hemolíticas. As causas **fora da membrana** (extrínsecas) incluem **hiperesplenismo**, uma condição em que o baço está aumentado por uma variedade de causas, e os eritrócitos são então seques-

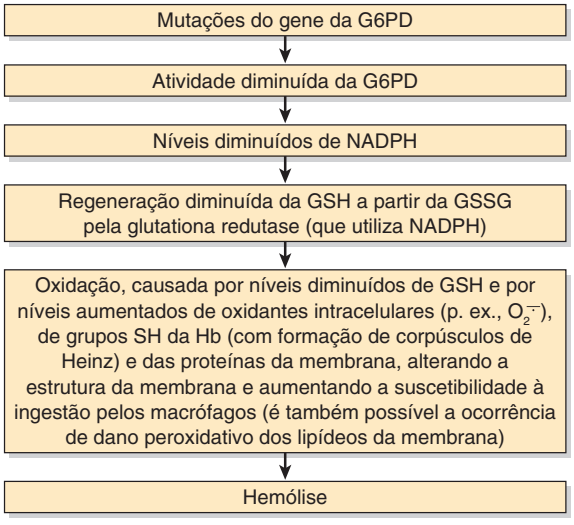


FIGURA 52-2 Resumo dos prováveis eventos que levam à anemia hemolítica causada pela deficiência da atividade da glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) (OMIM 305900).

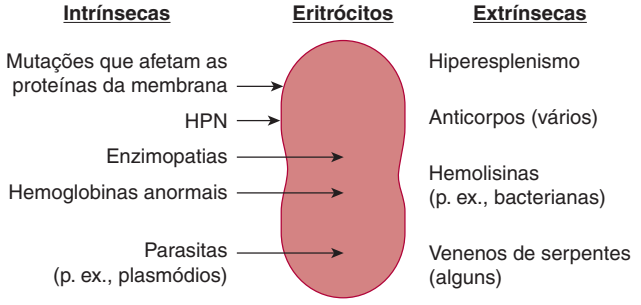


FIGURA 52-3 Representação esquemática de algumas causas de anemias hemolíticas. As causas extrínsecas provêm de fora do eritrócito; incluem hiperesplenismo, vários anticorpos, determinadas hemolisinas bacterianas e alguns venenos de serpentes. As causas intrínsecas dos eritrócitos incluem mutações que afetam as estruturas das proteínas de membrana (p. ex., esferocitose hereditária e eliptocitose hereditária), HPN (hemoglobinúria paroxística noturna, ver Capítulo 47), enzimopatias, hemoglobinas anormais e determinados parasitas (p. ex., plasmódios que causam a malária).

TABELA 52-6 Exames laboratoriais que ajudam no estabelecimento do diagnóstico de anemia hemolítica

Exames gerais e achados
Aumento da bilirrubina não conjugada (indireta)
Redução do tempo de sobrevida dos eritrócitos, determinada pela injeção de eritrócitos autólogos marcados com Cr^{51}
Reticulocitose
Níveis plasmáticos baixos de haptoglobina
Exames e achados específicos
Eletroforese da Hb (p. ex., HbS)
Enzimas eritrocitárias (p. ex., deficiência de G6PD ou de piruvato-quinase)
Fragilidade osmótica (p. ex., esferocitose hereditária)
Teste de Coombs[1]
Crioaglutinina

[1]O teste de Coombs direto detecta a presença de anticorpos nos eritrócitos, enquanto o teste indireto detecta a presença de anticorpos circulantes dirigidos contra antígenos presentes nos eritrócitos.

trados no órgão. **Vários anticorpos** (p. ex., reações transfusionais e anticorpos anti-Rh, presença de anticorpos quentes e frios no plasma que provocam lise dos eritrócitos) também estão nessa classe, assim como as **hemolisinas** liberadas por vários agentes infecciosos, como determinadas bactérias (p. ex., certas cepas de *Escherichia coli* e de clostrídios). Algumas serpentes liberam **venenos** que provocam lise da membrana eritrocitária (p. ex., por meio da ação de fosfolipases ou proteinases).

As causas **dentro da membrana** (intrínsecas) incluem anormalidades das proteínas. Os distúrbios mais importantes consistem na **esferocitose hereditária** e **eliptocitose hereditária**, que são principalmente causadas por anormalidades na quantidade ou na estrutura da espectrina (ver adiante). A **hemoglobinúria paroxística noturna** é discutida no Capítulo 47.

As causas no **interior do eritrócito** (também intrínsecas) incluem as **hemoglobinopatias** e as **enzimopatias**. A anemia falciforme e as talassemias constituem as hemoglobinopatias mais prevalentes. As anormalidades das enzimas da via das pentoses-fosfato e da glicólise constituem as enzimopatias mais frequentes envolvidas, particularmente da primeira via. A deficiência de **glicose-6-fosfato-desidrogenase** é prevalente em certas regiões do mundo e constitui uma causa constante de anemia hemolítica (ver anteriormente). A deficiência de **piruvato-quinase** não é frequente, porém constitui a segunda deficiência enzimática mais comum que resulta em anemia hemolítica; o mecanismo parece ser devido ao comprometimento da glicólise, com consequente formação diminuída de ATP, afetando vários aspectos da integridade da membrana. As infecções **parasitárias** (p. ex., plasmódios que causam malária) também constituem causas importantes de anemias hemolíticas em determinadas áreas geográficas.

A **Tabela 52-6** fornece uma lista dos exames laboratoriais que ajudam a estabelecer o diagnóstico de anemia hemolítica.

A metemoglobina não tem utilidade no transporte de oxigênio

O ferro ferroso da hemoglobina é suscetível à oxidação pelo superóxido e por outros agentes oxidantes, formando a **metemoglobina**, que é incapaz de transportar o oxigênio. No sangue normal, existe apenas uma quantidade muito pequena de metemoglobina, visto que os eritrócitos dispõem de um sistema efetivo (o sistema de NADH-citocromo b_5 metemoglobina-redutase) para reduzir o Fe^{3+} do heme de volta ao estado de Fe^{2+}. Esse sistema consiste em **NADH** (gerado pela glicólise), em uma flavoproteína denominada **citocromo b_5** redutase (também conhecida como metemoglobina redutase) e **citocromo b_5**. O Fe^{3+} da metemoglobina é reduzido novamente ao estado de Fe^{2+} pela ação do citocromo b_5 reduzido:

$$Hb - Fe^{3+} + Cit\ b_{5red} \rightarrow Hb - Fe^{2+} + Cit\ b_{5ox}$$

Em seguida, o citocromo b_5 reduzido é regenerado pela ação da citocromo b_5 redutase:

$$Cit\ b_{5ox} + NADH \rightarrow Cit\ b_{5red} + NAD$$

A metemoglobinemia é hereditária ou adquirida

A **metemoglobinemia** pode ser classificada em **hereditária** ou **adquirida** por ingestão de determinados fármacos e substâncias químicas. Nenhum desses tipos ocorre com frequência, porém os médicos precisam estar atentos para a sua possibilidade. A forma hereditária é geralmente causada pela atividade deficiente da **citocromo b_5** redutase; entretanto, a ocorrência de mutações também pode afetar a atividade da citocromo b_5. Certas **hemoglobinas anormais** (p. ex., HbM) também constituem causas raras de metemoglobinemia. Na HbM, a mutação modifica o resíduo de aminoácido ao qual o heme está ligado, alterando, desse modo, a sua afinidade pelo oxigênio e favorecendo a sua oxidação. A ingestão de **determinados fármacos** (p. ex., sulfonamidas) ou **substâncias químicas** (p. ex., anilina) pode causar metemoglobinemia adquirida. A cianose (coloração azulada da pele e das mucosas, devido à presença de quantidades aumentadas de hemoglobina desoxigenada no sangue arterial ou, neste caso, devido a quantidades aumentadas de metemoglobina) muitas vezes

constitui o sinal inicial observado em ambos os tipos e torna-se evidente quando 10% da hemoglobina encontram-se na forma "mete". O diagnóstico é estabelecido pela análise espectroscópica do sangue, que revela o espectro de absorção característico da metemoglobina. Além disso, uma amostra de sangue contendo metemoglobina não pode ser totalmente reoxigenada pela exposição ao oxigênio, como ocorre com o sangue desoxigenado normal. Pode-se utilizar a eletroforese para confirmar a presença de uma hemoglobina normal. A ingestão de **azul-de-metileno** ou de **ácido ascórbico** (ambos redutores) é utilizada no tratamento da metemoglobinemia discreta causada por deficiência enzimática. A metemoglobinemia maciça aguda (causada pela ingestão de substâncias químicas) deve ser tratada com injeção intravenosa de azul-de-metileno.

EXISTE UM MAIOR CONHECIMENTO SOBRE A MEMBRANA DO ERITRÓCITO HUMANO DO QUE SOBRE A MEMBRANA DE SUPERFÍCIE DE QUALQUER OUTRA CÉLULA HUMANA

Diversas abordagens bioquímicas têm sido utilizadas para estudar a membrana do eritrócito. Essas abordagens incluem a análise das proteínas de membrana por SDS-PAGE, o uso de enzimas específicas (proteinases, glicosidases e outras) para determinar a localização das proteínas e das glicoproteínas na membrana, e várias técnicas para estudar a composição dos lipídeos e a disposição de cada um deles. As técnicas morfológicas (p. ex., microscopia eletrônica e microscopia eletrônica de congelamento-fratura) e outras modalidades (p. ex., uso de anticorpos dirigidos contra componentes específicos) também têm sido amplamente utilizadas. Quando os eritrócitos são lisados em condições específicas, suas membranas voltam a se fechar em sua orientação original, formando **fantasmas** (fantasmas do lado direito). Ao modificar as condições, os fantasmas também podem voltar a se fechar com a superfície citosólica exposta para o exterior (fantasmas ao avesso). Ambos os tipos de fantasmas têm sido úteis para analisar a disposição das proteínas e lipídeos específicos na membrana. Nesses últimos anos, os cDNA de muitas proteínas dessa membrana tornaram-se disponíveis, possibilitando a dedução de suas sequências de aminoácidos e seus domínios. Em suma, existe um maior conhecimento sobre a membrana do eritrócito do que sobre qualquer outra membrana das células humanas (**Tabela 52-7**).

A análise por SDS-PAGE identifica as proteínas da membrana do eritrócito

Quando membranas dos eritrócitos são analisadas por **SDS-PAGE,** são identificadas cerca de 10 proteínas principais (**Figura 52-4**), várias das quais consistem em **glicoproteínas**. Sua migração na SDS-PAGE foi utilizada para designar essas proteínas: as que migram mais lentamente (e, portanto, as que têm maior massa molecular) são designadas como banda 1 ou **espectrina**. Todas essas proteínas principais foram isoladas, a maioria delas foi identificada, e foram obtidas informações consideráveis acerca de suas funções (**Tabela 52-8**). Muitas de suas sequências de aminoácidos também foram estabelecidas. Além disso, foram determinadas quais dessas proteínas de membrana são proteínas integrais ou periféricas, quais estão situadas na superfície externa, quais estão na superfície citosólica e quais delas atravessam a membrana de um lado a outro (**Figura 52-5**). Muitos componentes menores também podem ser detectados na membrana eritrocitária com o uso de métodos sensíveis de coloração ou com a eletroforese em gel bidimensional. Um desses componentes é o transportador de glicose descrito anteriormente.

TABELA 52-7 Resumo das informações bioquímicas sobre a membrana do eritrócito humano

- A membrana é uma bicamada composta de ~50% de lipídeos e 50% de proteínas.
- As principais classes de lipídeos consistem em fosfolipídeos e colesterol; os principais fosfolipídeos são a fosfatidilcolina (PC), a fosfatidiletanolamina (PE) e a fosfatidilserina (PS), juntamente com a esfingomielina (Sph).
- Os fosfolipídeos que contêm colina, a PC e a Sph, predominam na camada externa, enquanto os fosfolipídeos que contêm amino (PE e PS) estão localizados na camada interna.
- Os glicoesfingolipídeos (GSL) (GLS neutros, gangliosídeos e espécies complexas, incluindo as substâncias do grupo sanguíneo ABO) constituem cerca de 5 a 10% dos lipídeos totais.
- A análise por SDS-PAGE revela que a membrana contém ~10 proteínas principais e >100 espécies menores.
- As proteínas principais (que incluem a espectrina, a anquirina, a proteína trocadora de ânions, a actina e a banda 4.1) têm sido estudadas de modo intensivo, e as principais características de sua disposição (p. ex., integrais ou periféricas), estrutura e função foram estabelecidas.
- Muitas das proteínas são glicoproteínas (p. ex., glicoforinas) que contêm cadeias oligossacarídicas O- ou N-ligadas (localizadas na superfície externa da membrana).

As principais proteínas integrais da membrana dos eritrócitos consistem na proteína trocadora de ânions e nas glicoforinas

A **proteína trocadora de ânions** (**banda 3**) é uma glicoproteína transmembrana, cuja extremidade carboxiterminal está na superfície externa da membrana, enquanto a extremidade aminoterminal está localizada na superfície citoplasmática. Trata-se de um exemplo de proteína de membrana de **multipassagem**, pois ela atravessa a bicamada aproximadamente 14 vezes. Ela ocorre provavelmente na forma de dímero na membrana, onde forma um túnel para possibilitar a troca de cloreto por bicarbonato. O dióxido de carbono, produzido nos tecidos, entra nos eritrócitos na forma de bicarbonato, que é trocado pelo cloreto nos pulmões, onde o dióxido de carbono é exalado. A extremidade aminoterminal liga-se a muitas proteínas, incluindo a hemoglobina, proteínas 4.1 e 4.2, anquirina e várias enzimas glicolíticas. A banda 3 purificada também foi acrescentada a vesículas lipídicas *in vitro,* e foi constatado que ela exerce suas funções de transporte nesse sistema reconstituído.

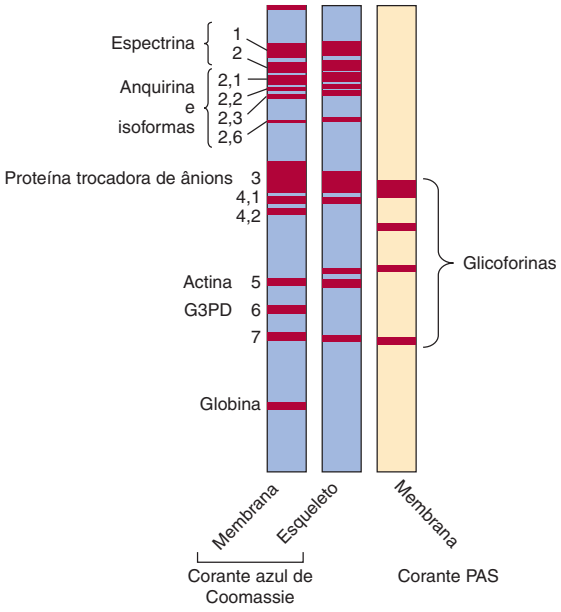


FIGURA 52-4 Representação esquemática das principais proteínas da membrana do eritrócito humano separadas por SDS-PAGE. As bandas detectadas por coloração com azul de Coomassie são mostradas nas duas faixas da esquerda, enquanto as glicoproteínas detectadas por coloração com o reagente ácido periódico de Schiff (PAS) são mostradas na faixa de direita. A direção da migração eletroforética é de cima para baixo. (Reproduzida, com autorização, de Beck WS, Tepper RI: Hemolytic anemias III: membrane disorders. In: *Hematology,* 5th ed. Beck WS (editor). The MIT Press, 1991.)

TABELA 52-8 Principais proteínas da membrana eritrocitária

Número da banda[1]	Proteína	Integral (I) ou periférica (P)	Massa molecular aproximada (kDa)
1	Espectrina (α)	P	240
2	Espectrina (β)	P	220
2.1	Anquirina	P	210
2.2	Anquirina	P	195
2.3	Anquirina	P	175
2.6	Anquirina	P	145
3	Proteína de troca de ânions	I	100
4.1	Não nomeada	P	80
5	Actina	P	43
6	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase	P	35
7	Tropomiosina	P	29
8	Não nomeada	P	23
	Glicoforinas A, B e C	I	31, 23 e 28

Fonte: Adaptada de Lux DE, Becker PS: Disorders of the red cell membrane skeleton: hereditary spherocytosis and hereditary elliptocytosis. In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease,* 6th ed. Scriver CR et al. (editors). McGrawHill, 1989. Capítulo 95.
[1]O número da banda refere-se à posição de migração na SDS-PAGE (ver Figura 52-4). As glicoforinas são detectadas pela sua coloração com o reagente ácido periódico de Schiff. Vários outros componentes (p. ex., 4.2 e 4.9) não estão listados. A espectrina nativa é $\alpha_2\beta_2$.

As **glicoforinas A, B e C** também são glicoproteínas transmembrana, porém do tipo de **passagem única**, já que se estendem através da membrana apenas uma vez. A glicoforina A é a principal glicoforina, constituída de até 131 aminoácidos e maciçamente glicosilada (cerca de 60% de sua massa). A extremidade aminoterminal, que contém 16 cadeias oligossacarídicas (das quais 15 consistem em O-glicanos), faz protrusão na superfície do eritrócito. Cerca de 90% do ácido siálico da membrana eritrocitária estão localizados nessa proteína. O segmento transmembrana (23 aminoácidos) é α-helicoidal. A extremidade carboxiterminal estende-se para dentro do citosol e liga-se à proteína 4.1 que, por sua vez, liga-se à espectrina. O **polimorfismo** dessa proteína constitui a base do sistema de grupo sanguíneo MN (ver adiante). A glicoforina A contém sítios de ligação para o vírus *influenza* e para o *Plasmodium falciparum,* que constitui a causa de uma forma de malária. Curiosamente, a função dos eritrócitos de indivíduos que carecem da glicoforina A não parece ser afetada.

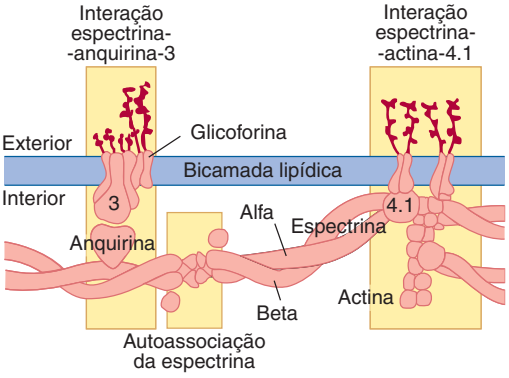


FIGURA 52-5 Ilustração esquemática da interação das proteínas do citoesqueleto entre si e com determinadas proteínas integrais da membrana do eritrócito. (Reproduzida, com autorização, de Beck WS, Tepper RI: Hemolytic anemias III: membrane disorders. In: *Hematology*, 5th ed. Beck WS (editor). The MIT Press, 1991.)

A espectrina, a anquirina e outras proteínas de membrana periféricas ajudam a determinar o formato e a flexibilidade do eritrócito

O eritrócito precisa ser capaz de se comprimir através de alguns pontos estreitos da microcirculação durante suas numerosas passagens pelo corpo; nesse aspecto, os sinusoides do baço são particularmente importantes. Para que o eritrócito seja fácil e reversivelmente **deformável**, sua membrana precisa ser tanto fluida quanto flexível; além disso, deve conservar a sua forma de disco bicôncavo, visto que isso facilita a troca gasosa. Os **lipídeos** da membrana ajudam a determinar a sua fluidez. Fixadas à superfície interna da membrana eritrocitária, existem várias **proteínas citoesqueléticas periféricas** (Tabela 52-8), que desempenham funções importantes na preservação da morfologia e flexibilidade do eritrócito; essas proteínas serão descritas a seguir.

A **espectrina** é a principal proteína do citoesqueleto. É composta de dois polipeptídeos: a espectrina 1 (cadeia α) e a espectrina 2 (cadeia β). Essas cadeias, cujo comprimento é de aproximadamente 100 nm, estão alinhadas em sentido antiparalelo e estão frouxamente entrelaçadas, formando um dímero. Ambas as cadeias são formadas por segmentos de 106 aminoácidos, que parecem dobrar-se em hélices α tríplices unidas por segmentos não helicoidais. Um dímero interage com outro, formando um tetrâmero cabeça-cabeça. O formato global confere **flexibilidade** à proteína e, por sua vez, à membrana do eritrócito. Pelo menos quatro **sítios de ligação** podem ser definidos na espectrina: (1) para autoassociação, (2) para a anquirina (bandas 2.1, etc), (3) para a actina (banda 5), e (4) para a proteína 4.1.

A **anquirina** é uma proteína em forma de pirâmide, que **se liga à espectrina**. Por sua vez, a anquirina liga-se firmemente à banda 3, assegurando a fixação da espectrina à membrana. A anquirina é sensível à proteólise, explicando o aparecimento das bandas 2.2, 2.3 e 2.6, sendo todas derivadas da banda 2.1.

A **actina** (banda 5) é encontrada nos eritrócitos na forma de filamentos curtos em dupla-hélice de F-actina. A extremidade distal dos dímeros de espectrina liga-se à actina, e esta liga-se também à proteína 4.1.

A **proteína 4.1**, uma proteína globular, liga-se firmemente à extremidade distal da espectrina, próximo ao sítio de ligação da actina desta última e, portanto, constitui parte de um complexo ternário de proteína 4.1-espectrina-actina. A proteína 4.1 liga-se também às proteínas integrais, as glicoforinas A e C, fixando, dessa maneira, o complexo ternário à membrana. Além disso, a proteína 4.1 pode interagir com alguns fosfolipídeos da membrana, conectando, assim, a bicamada lipídica ao citoesqueleto.

Algumas outras proteínas (4.9, aducina e tropomiosina) também participam na **montagem do citoesqueleto**.

As anormalidades quantitativas ou estruturais da espectrina provocam esferocitose e eliptocitose hereditárias

A **esferocitose hereditária** é uma doença genética, transmitida como traço autossômico dominante, que acomete cerca de 1:5.000 norte-americanos. A doença caracteriza-se pela presença de esferócitos (eritrócitos esféricos com baixa razão superfície-volume) no sangue periférico, por **anemia hemolítica** (ver Figura 52-3) e por esplenomegalia. Os esferócitos não são tão deformáveis quanto os eritrócitos normais e estão sujeitos à sua destruição no baço, resultando em um acentuado encurtamento do tempo de sobrevida na circulação. A esferocitose hereditária é **curável por esplenectomia**, visto que os esferócitos podem sobreviver na circulação se o baço estiver ausente.

Os esferócitos são muito mais suscetíveis à lise osmótica do que os eritrócitos normais. Essa suscetibilidade é avaliada pelo **teste de fragilidade osmótica**, em que os eritrócitos são expostos *in vitro* a concentrações decrescentes de NaCl. A concentração fisiológica de NaCl é de 0,85 g/dL. Quando expostos a uma concentração de NaCl de 0,5 g/dL, ocorre hemólise de uma quantidade muito pequena de eritrócitos normais, enquanto cerca de 50% dos esferócitos sofrem lise nessas condições. A explicação é que o esferócito, por ser quase circular, tem pouco volume extrapotencial para acomodar a água adicional e, por isso, sofre lise prontamente quando é exposto a uma pressão osmótica ligeiramente menor do que a normal.

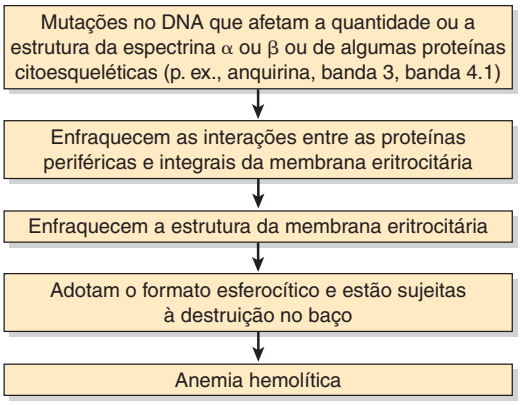


FIGURA 52-6 Resumo da etiologia da esferocitose hereditária (OMIM 182900). Aproximadamente 50% dos casos devem-se a anormalidades da anquirina e 25%, a anormalidades da espectrina.

Uma das causas da esferocitose hereditária (**Figura 52-6**) consiste na deficiência quantitativa de **espectrina** ou em anormalidades na sua estrutura, de modo que ela não é mais capaz de se ligar firmemente às outras proteínas com as quais interage normalmente. Isso enfraquece a membrana e resulta no formato esferocítico. As anormalidades da **anquirina** e das **bandas 3**, **4.1** e **4.2** estão envolvidas em outros casos.

A **eliptocitose hereditária** é um distúrbio genético semelhante à esferocitose hereditária, exceto que os eritrócitos acometidos assumem uma forma elíptica e discoide, identificável à microscopia. Deve-se também a anormalidades da **espectrina**; alguns casos refletem anormalidades da banda **4.1** ou da **glicoforina C**.

AS BASES BIOQUÍMICAS DO SISTEMA DE GRUPO SANGUÍNEO ABO FORAM ESTABELECIDAS

São reconhecidos aproximadamente 30 **sistemas de grupos sanguíneos** humanos, dos quais os mais conhecidos são os sistemas **ABO**, **Rh** (**Rhesus**) e **MN**. A expressão "**grupo sanguíneo**" aplica-se a um sistema definido de antígenos eritrocitários (substâncias de grupo sanguíneo) controlados por um *locus* gênico que apresenta uma quantidade variável de alelos (p. ex., A, B e O no sistema ABO). A expressão "**tipo sanguíneo**" refere-se ao fenótipo antigênico, geralmente reconhecido pelo uso de anticorpos apropriados. No que diz respeito à transfusão sanguínea, é particularmente importante conhecer as bases dos sistemas **ABO** e **Rh**. Entretanto, o conhecimento dos sistemas de grupos sanguíneos também é de interesse bioquímico, genético, imunológico, antropológico, obstétrico, patológico e forense. Nesta seção, serão discutidas apenas algumas das características fundamentais do **sistema ABO**. Do ponto de vista bioquímico, os principais interesses pelas substâncias do sistema ABO têm sido o isolamento e a determinação de suas estruturas, a elucidação das vias de biossíntese e a definição da natureza dos produtos dos genes A, B e O.

O sistema ABO é de suma importância na transfusão sanguínea

O sistema ABO foi descoberto em 1900 por Landsteiner, quando este estava investigando a base das transfusões compatíveis e incompatíveis nos seres humanos. Na maioria dos indivíduos, as membranas dos eritrócitos contêm uma substância do grupo sanguíneo do tipo A, tipo B, tipo AB ou tipo O. Os indivíduos do **tipo A** apresentam, em seu plasma, anticorpos anti-B e, portanto, irão aglutinar o sangue tipo B ou tipo AB. Os indivíduos do **tipo B** possuem anticorpos anti-A e irão aglutinar o sangue do tipo A ou do tipo AB. O sangue do **tipo AB** não apresenta anticorpos anti-A nem anti-B e foi designado como **receptor universal**. O sangue do **tipo O** não contém substâncias A nem B e foi designado como **doador universal**. A explicação para esses achados está relacionada com o fato de que o organismo muitas vezes não produz anticorpos contra seus próprios constituintes. Portanto, os indivíduos do tipo A não produzem anticorpos contra a substância de seu próprio grupo sanguíneo A, porém apresentam anticorpos dirigidos contra a substância estranha do grupo sanguíneo B, possivelmente devido à presença de estruturas semelhantes em microrganismos aos quais o corpo fica exposto no início da vida. Como os indivíduos do tipo O não têm substância A nem B, eles produzem anticorpos contra ambas as substâncias estranhas. Essa descrição foi consideravelmente simplificada; por exemplo, existem dois subgrupos do tipo A: A_1 e A_2.

Os genes responsáveis pela produção das substâncias do sistema ABO estão localizados no braço longo do cromossomo 9. Existem **três alelos**, dos quais dois são codominantes (A e B), enquanto o terceiro (O) é recessivo; esses alelos determinam, em última análise, os quatro produtos fenotípicos: as substâncias A, B, AB e O.

As substâncias ABO são glicoesfingolipídeos e glicoproteínas que compartilham cadeias oligossacarídicas em comum

As **substâncias ABO** são oligossacarídeos complexos existentes na maioria das células do corpo e em algumas secreções. Nas membranas dos eritrócitos, os oligossacarídeos que determinam as naturezas específicas das substâncias ABO parecem ocorrer, em sua maior parte, nos **glicoesfingolipídeos**, ao passo que, nas secreções, os mesmos oligossacarídeos estão presentes nas **glicoproteínas**. A sua presença nas secreções é determinada por um gene designado como *Se* (de **secretor**), que codifica uma **fucosil** (**Fuc**)**-transferase** específica nos órgãos secretores, como as glândulas exócrinas, mas que não é ativa nos eritrócitos. Os indivíduos com os genótipos *SeSe* ou *Sese* secretam os antígenos A ou B (ou ambos), enquanto os indivíduos com o genótipo *sese* não secretam essas substâncias, porém os seus eritrócitos podem expressar os antígenos A e B.

A substância H é o precursor da biossíntese das substâncias A e B

As substâncias ABO foram isoladas e as suas estruturas foram determinadas; a **Figura 52-7** apresenta versões simplificadas, mostrando apenas as suas extremidades não redutoras. Inicialmente, é importante reconhecer a estrutura da **substância H**, visto que ela é o precursor de ambas as substâncias A e B e também é a substância de grupo sanguíneo encontrada nos indivíduos do tipo O. A própria substância H é formada pela ação de uma **fucosiltransferase**, que catalisa a adição da fucose terminal na ligação $\alpha 1 \rightarrow 2$ ao resíduo Gal terminal de seu precursor:

$$\underset{\text{Precursor}}{\text{GDP} - \text{Fuc} + \text{Gal} - \beta - \text{R}} \rightarrow \underset{\text{Substância H}}{\text{Fuc} - \alpha 1{,}2 - \text{Gal} - \beta - \text{R}} + \text{GDP}$$

O *locus* H codifica essa fucosiltransferase. O alelo *h* do *locus* H codifica uma fucosiltransferase inativa; por isso, os indivíduos com genótipo *hh* são incapazes de produzir a substância H, que é o precursor dos antígenos A e B. Assim, os indivíduos com o genótipo *hh* apresentam eritrócitos do tipo O, embora possam ter as enzimas necessárias para produzir as substâncias A ou B (ver adiante). Esses indivíduos são conhecidos como portadores do fenótipo Bombay (O_h).

O *A* codifica uma GalNAc-transferase, o gene *B* codifica uma Gal-transferase e o gene *O* codifica um produto inativo

Em comparação com a substância H do grupo sanguíneo (Figura 52-7), a **substância A** contém uma GalNAc adicional, enquanto a **substância B** contém uma Gal adicional, ligada conforme indicado na figura. Os anticorpos anti-A são dirigidos contra o

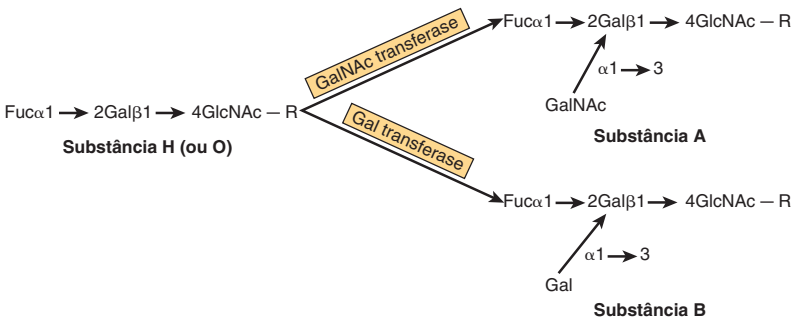


FIGURA 52-7 Representação esquemática das estruturas das substâncias dos grupos H, A e B. R representa uma cadeia oligossacarídica complexa e longa, ligada à ceramida, onde as substâncias são glicoesfingolipídeos, ou à estrutura polipeptídica de uma proteína por meio de um resíduo de serina ou treonina, onde as substâncias são glicoproteínas. Observe que as substâncias dos grupos sanguíneos são biantenares, isto é, apresentam dois braços formados em um ponto de bifurcação (não indicado) entre GlcNAc, e a figura mostra apenas um dos braços da ramificação. Desta forma, as substâncias H, A e B contêm, cada uma delas, dois de suas respectivas cadeias oligossacarídicas curtas ilustradas aqui. A substância AB apresenta uma cadeia tipo A e uma cadeia tipo B.

resíduo GalNAc adicional presente na substância A, enquanto os anticorpos anti-B são dirigidos contra o resíduo Gal adicional existente na substância B. Portanto, o resíduo GalNAc é o **açúcar imunodominante** (ou seja, aquele que determina a especificidade do anticorpo produzido) da substância do grupo sanguíneo A, enquanto a Gal é o açúcar imunodominante da substância B. Tendo em vista os achados estruturais, não é surpreendente constatar que a substância A pode ser sintetizada *in vitro* a partir da substância O, em uma reação catalisada por uma GalNAc transferase, utilizando UDP GalNAc como doador do açúcar. De forma semelhante, o grupo sanguíneo B pode ser sintetizado a partir da substância O pela ação de uma Gal transferase, que utiliza UDP Gal. É fundamental entender que o produto do gene *A* é a **GalNAc transferase**, que acrescenta a GalNAc terminal à substância O. De modo semelhante, o produto do gene *B* é a **Gal transferase**, que acrescenta o resíduo Gal à substância O. Os indivíduos do **tipo AB** possuem ambas as enzimas e, portanto, apresentam duas cadeias oligossacarídicas (Figura 52-6), uma que termina com GalNAc, e a outra com Gal. Os indivíduos do tipo O aparentemente sintetizam uma proteína inativa, que é detectável por técnicas imunológicas; deste modo, a substância H é a sua substância do grupo sanguíneo ABO.

Em 1990, um estudo com técnicas de clonagem e de sequenciamento descreveu a natureza das diferenças entre os produtos de glicosiltransferase dos genes *A, B* e *O.* Aparentemente, uma diferença de quatro nucleotídeos é responsável pelas especificidades distintas das glicosiltransferases A e B. Por outro lado, o alelo *O* apresenta uma mutação de um único par de bases, produzindo uma **mutação de fase de leitura** que resulta em uma proteína com ausência de atividade de transferase.

TABELA 52-9 Resumo das principais características bioquímicas dos neutrófilos

- Glicólise ativa
- Via ativa das pentoses-fosfato
- Fosforilação oxidativa moderada
- Ricos em lisossomos e em suas enzimas de degradação
- Contêm determinadas enzimas específicas (p. ex., mieloperoxidase e NADPH oxidase) e proteínas
- Contêm as integrinas CD11/CD18 na membrana plasmática

OS NEUTRÓFILOS APRESENTAM METABOLISMO ATIVO E CONTÊM VÁRIAS ENZIMAS E PROTEÍNAS SINGULARES

A **Tabela 52-9** fornece um resumo das principais características bioquímicas dos **neutrófilos**. As características proeminentes consistem em glicólise aeróbica ativa, via ativa das pentoses fosfato, fosforilação oxidativa moderadamente ativa (em virtude da relativa escassez das mitocôndrias) e elevado teor de enzimas lisossomais. Muitas das enzimas listadas na Tabela 52-5 também são importantes no metabolismo oxidativo dos neutrófilos (ver adiante). A **Tabela 52-10** fornece um resumo das funções de algumas proteínas relativamente específicas dos neutrófilos.

TABELA 52-10 Algumas enzimas e proteínas importantes dos neutrófilos[1]

Enzima ou proteína	Reação catalisada ou função	Comentário
Mieloperoxidase (MPO)	$H_2O_2 + X^-$ (haleto) $+ H^+ \rightarrow HOX + H_2O$ (onde $X^- = Cl^-$, HOX = ácido hipocloroso)	Responsável pela cor esverdeada do pus A deficiência genética pode causar infecções recorrentes
NADPH oxidase	$2O_2 + NADPH \rightarrow 2O_2^- + NADP + H^+$	Componente fundamental da explosão respiratória Deficiente na doença granulomatosa crônica
Lisozima	Hidrolisa a ligação entre o ácido *N*-acetilmurâmico e a *N*-acetil-D-glicosamina encontrados nas paredes celulares de determinadas bactérias	Abundante nos macrófagos
Defensinas	Peptídeos antibióticos básicos de 20 a 33 aminoácidos	Destroem aparentemente as bactérias, provocando dano nas membranas
Lactoferrina	Proteína de ligação do ferro	Pode inibir o crescimento de certas bactérias por meio de sua ligação ao ferro e pode estar envolvida na regulação da proliferação das células mieloides
CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18[2]	Moléculas de adesão (membros da família das integrinas)	Deficientes na deficiência de adesão dos leucócitos tipo I (OMIM 116920)
Receptores dos fragmentos Fc das IgG	Ligam-se aos fragmentos Fc das moléculas de IgG	Direcionam os complexos antígeno-anticorpo para as células mieloides e linfoides, desencadeando o processo de fagocitose e outras respostas

[1]A expressão de muitas dessas moléculas foi estudada durante vários estágios de diferenciação dos neutrófilos, bem como das células leucêmicas correspondentes, utilizando técnicas de biologia molecular (p. ex., determinações dos mRNAs específicos). Na maioria dos casos, os cDNA foram isolados e sequenciados, as sequências dos aminoácidos foram deduzidas, os genes foram identificados em locais cromossômicos específicos, e as sequências dos éxons e dos íntrons foram definidas. Algumas proteinases importantes dos neutrófilos estão listadas na Tabela 52-13.

[2]CD = grupo de diferenciação. Essa expressão refere-se a um sistema uniforme de nomenclatura que foi adotado para descrever os marcadores de superfície dos leucócitos. Uma proteína de superfície específica (marcador), que identifica determinada linhagem ou estágio de diferenciação dos leucócitos e que é reconhecida por um grupo de anticorpos monoclonais, é conhecida como membro de um grupo de diferenciação. Esse sistema mostra-se particularmente útil para classificação dos subtipos de linfócitos. Muitos antígenos CD estão envolvidos nas interações entre células, na adesão e na sinalização transmembrana.

Os neutrófilos são protagonistas essenciais na defesa do organismo contra infecções bacterianas

Os **neutrófilos** são células fagocitárias móveis do sistema imune inato que desempenham um papel fundamental na inflamação aguda. Quando as bactérias entram nos tecidos, ocorrem vários fenômenos coletivamente conhecidos como "resposta inflamatória aguda". Incluem (1) o aumento da permeabilidade vascular, (2) a entrada dos neutrófilos ativados nos tecidos, (3) a ativação das plaquetas, e (4) a regressão (resolução) espontânea, se os microrganismos invasores forem erradicados com sucesso.

Durante a inflamação aguda, ocorre liberação de diversas moléculas das células e proteínas plasmáticas, cujo efeito global efetivo consiste em aumento da permeabilidade vascular, resultando em edema tecidual **(Tabela 52-11).**

Na inflamação aguda, os neutrófilos são recrutados da corrente sanguínea para os tecidos para ajudar a eliminar os invasores estranhos. Os neutrófilos são atraídos para os tecidos por **fatores quimiotáticos,** incluindo o fragmento C5a do complemento, peptídeos pequenos derivados das bactérias (p. ex., *N*-formil-metionil-leucil-fenilalanina) e diversos leucotrienos. Para alcançar os tecidos, os neutrófilos circulantes precisam atravessar os capilares. Para isso, os neutrófilos migram ao longo das paredes vasculares e, em seguida, aderem às células endoteliais (de revestimento) dos capilares.

TABELA 52-11 Fontes de biomoléculas com propriedades vasoativas envolvidas na inflamação aguda

Mastócitos e basófilos	Plaquetas	Neutrófilos	Proteínas plasmáticas
Histamina	Serotonina	Fator de ativação das plaquetas (PAF)	C3a, C4a e C5a do sistema complemento
		Eicosanoides (várias prostaglandinas e leucotrienos)	Bradicinina e produtos de degradação da fibrina provenientes do sistema da coagulação

As integrinas medeiam a adesão dos neutrófilos às células endoteliais

A **adesão dos neutrófilos** às células endoteliais requer a presença de proteínas de adesão específicas **(integrinas)** localizadas em sua superfície, bem como proteínas receptoras específicas nas células endoteliais. (Ver também a descrição das **selectinas** no Capítulo 47).

As **integrinas** constituem uma superfamília de proteínas de superfície presentes em uma grande variedade de células. As integrinas estão envolvidas na **adesão** das células a outras células ou a componentes específicos da matriz extracelular. Formam **heterodímeros,** que contêm uma subunidade α e uma subunidade β ligadas de modo não covalente. As subunidades contêm segmentos extracelulares, transmembrana e intracelulares. Os **segmentos extracelulares** ligam-se a uma variedade de ligantes, como proteínas específicas da matriz extracelular e das superfícies de outras células. Com frequência, esses ligantes contêm sequências de ArgGlyAsp (R-G-D). Os **domínios intracelulares** ligam-se a várias proteínas do citoesqueleto, como a actina e a vinculina. As integrinas são proteínas que **ligam a superfície externa das células ao seu interior,** ajudando, assim, a integrar as respostas celulares (p. ex., movimento e fagocitose) a alterações do meio externo.

Inicialmente, foram identificadas três **subfamílias** de integrinas. Os membros de cada subfamília foram diferenciados pela presença de uma subunidade β comum, porém diferem em suas subunidades. Todavia, atualmente foram identificadas mais de três subunidades β, e a classificação das integrinas tornou-se bastante complexa. A **Tabela 52-12** fornece uma lista de interesse específico no que diz respeito aos neutrófilos.

A deficiência da subunidade β_2 (também designada como CD18) do LFA-1 e de duas integrinas relacionadas, presentes nos neutrófilos e nos macrófagos, Mac-1 (CD11b/CD18) e p150.95 (CD11c/CD18), causa a **deficiência de adesão dos leucócitos tipo I**, doença caracterizada por infecções bacterianas e fúngicas recidivas. Entre as várias consequências dessa deficiência, ocorre uma diminuição na adesão dos leucócitos afetados às

TABELA 52-12 Exemplos de integrinas que são importantes na função dos neutrófilos, de outros leucócitos e das plaquetas[1]

Integrina	Célula	Subunidade	Ligante	Função
VLA-1 (CD49a)	Leucócitos, outras células	α1β1	Colágeno, laminina	Adesão da célula à MEC
VLA-5 (CD49e)	Leucócitos, outras células	α5β1	Fibronectina	Adesão da célula à MEC
VLA-6 (CD49f)	Leucócitos, outras células	α6β1	Laminina	Adesão da célula à MEC
LFA-1 (CD11a)	Leucócitos	αLβ2	ICAM-1	Adesão dos leucócitos
Glicoproteína IIb/IIIa	Plaquetas	αIIbβ3	ICAM-2	
Fibrinogênio, fibronectina, fator de von Willebrand	Adesão e agregação das plaquetas			

[1]LFA-1, antígeno 1 associado à função linfocitária; VLA, antígeno muito tardio; CD, grupo de diferenciação; ICAM, molécula de adesão intercelular; MEC, matriz extracelular. A deficiência de LFA-1 e de integrinas relacionadas é encontrada na deficiência de adesão dos leucócitos tipo 1 (OMIM 116920). A deficiência do complexo de glicoproteína IIb/IIIa das plaquetas ocorre na trombastenia de Glanzmann (OMIM 273800), um distúrbio caracterizado por história de sangramento, contagem normal de plaquetas e retração anormal do coágulo. Esses achados ilustram como o conhecimento básico das proteínas de adesão da superfície celular pode esclarecer a etiologia de diversas doenças.

células endoteliais, e, como consequência, quantidades menores de neutrófilos entram nos tecidos para combater a infecção.

Após terem atravessado as paredes dos vasos sanguíneos de pequeno calibre, os neutrófilos migram para as concentrações mais altas de fatores quimiotáticos, entram em contato com as bactérias invasoras e procuram atacá-las e destruí-las. Os neutrófilos precisam ser **ativados** para desencadear muitos dos processos metabólicos envolvidos na fagocitose e na destruição das bactérias.

A ativação dos neutrófilos é semelhante à ativação das plaquetas e envolve a hidrólise do fosfatidilinositol bifosfato

Os mecanismos envolvidos na ativação das plaquetas são discutidos no Capítulo 51 (ver Figura 51-8). O processo envolve a interação do estímulo (p. ex., trombina) com um receptor, a ativação das proteínas G, a estimulação da fosfolipase C e a liberação de inositol trifosfato e diacilglicerol a partir do fosfatidilinositol bifosfato. Estes dois mensageiros secundários resultam em elevação do Ca^{2+} intracelular e na ativação da proteinoquinase C. Além disso, a ativação da fosfolipase A_2 produz ácido araquidônico, que pode ser convertido em uma variedade de eicosanoides biologicamente ativos.

O processo de **ativação dos neutrófilos** é essencialmente semelhante. Os neutrófilos são ativados, por meio de receptores específicos, pela sua interação com bactérias, por ligação dos fatores quimiotáticos ou complexos antígeno-anticorpo. A consequente **elevação do Ca^{2+} intracelular** afeta muitos processos que ocorrem nos neutrófilos, como a montagem dos microtúbulos e o sistema de actina-miosina. Esses processos estão envolvidos, respectivamente, na secreção do conteúdo dos grânulos e na motilidade, permitindo aos neutrófilos lançar-se à procura dos invasores. Nesse estágio, os neutrófilos ativados estão prontos para destruir os invasores por mecanismos que incluem a produção de derivados ativos do oxigênio.

A explosão respiratória das células fagocitárias envolve a NADPH oxidase e ajuda a destruir as bactérias

Quando os neutrófilos e outras células fagocitárias englobam as bactérias, eles apresentam um rápido aumento no consumo de oxigênio, conhecido como **explosão respiratória**. Esse fenômeno reflete a utilização rápida do oxigênio (depois de um intervalo de 15 a 60 s) e a produção de grandes quantidades de **derivados reativos** a partir dele, como $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2, $OH^{\cdot}$ e OCl^- (íon hipoclorito). Alguns desses produtos são agentes microbicidas potentes.

O **sistema da cadeia de transporte de elétrons,** responsável pela explosão respiratória (conhecido como NADPH oxidase) é formado por vários componentes. Um deles é o **citocromo b_{558}**, localizado na membrana plasmática; trata-se de um heterodímero, que contém dois polipeptídeos de 91 kDa e 22 kDa. Quando o sistema é ativado (ver adiante), dois polipeptídeos citoplasmáticos de 47 kDa e 67 kDa são recrutados para a membrana plasmática e, juntamente com o citocromo b_{558}, constituem **a NADPH oxidase**, responsável pela explosão respiratória. A Tabela 52-5 (reação 2) mostra a reação catalisada pela NADPH oxidase, envolvendo a formação de ânion superóxido. Esse sistema catalisa a redução de um elétron do oxigênio a um ânion superóxido. O NADPH é gerado principalmente pelo ciclo das pentoses-fosfato, cuja atividade aumenta acentuadamente durante a fagocitose.

A reação descrita anteriormente é seguida da produção espontânea (por dismutação espontânea) do **peróxido de hidrogênio** a partir de duas moléculas de superóxido:

$$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

O **íon superóxido** é liberado para fora da célula ou dentro de fagolisossomos, onde entra em contato com as bactérias ingeridas. A destruição das bactérias dentro dos fagolisossomos parece depender da ação combinada do pH elevado, do íon superóxido ou de outros derivados do oxigênio (H_2O_2, $OH^{\cdot}$ e HOCl [ácido hipocloroso; ver adiante]) e da ação de determinados peptídeos bactericidas (defensinas) e outras proteínas (p. ex., catepsina G e algumas proteínas catiônicas) presentes nas células fagocitárias. Todas as moléculas de superóxido que entram no citosol da célula fagocitária são convertidas em H_2O_2 pela ação da **superóxido dismutase**, que catalisa a mesma reação da dismutação espontânea descrita anteriormente. Por sua vez, o H_2O_2 é utilizado pela mieloperoxidase (ver adiante) ou eliminado pela ação da glutationa peroxidase ou catalase.

A **NADPH oxidase** é inativa nas células fagocitárias em repouso, porém é **ativada** em consequência do seu contato com vários ligantes (fragmento C5a do complemento, peptídeos quimiotáticos, etc) com receptores da membrana plasmática. Os eventos que levam à ativação do sistema da oxidase foram detalhadamente estudados e assemelham-se aos descritos anteriormente para o processo de ativação dos neutrófilos. Envolvem as **proteínas G**, a ativação da **fosfolipase C** e a geração do **inositol-1,4,5-trifosfato** (IP_3). Este último composto medeia um aumento transitório do nível de Ca^{2+} no citosol, que é essencial para a indução da explosão respiratória. O **diacilglicerol** também é formado e induz a translocação da proteinoquinase C do citosol para a membrana plasmática, onde catalisa a **fosforilação** de várias proteínas, algumas das quais são componentes do sistema da oxidase. Uma segunda via de ativação, que não envolve o Ca^{2+}, também atua no processo.

As mutações dos genes que codificam componentes do sistema da NADPH oxidase causam a doença granulomatosa crônica

A importância do **sistema da NADPH oxidase** ficou claramente demonstrada quando foi observado que a explosão respiratória estava deficiente na **doença granulomatosa crônica**, um distúrbio relativamente incomum, caracterizado por infecções recidivantes e granulomas disseminados (lesões inflamatórias crônicas) na pele, nos pulmões e nos linfonodos. Os granulomas formam-se em uma tentativa de isolar as bactérias que não foram destruídas, devido a deficiências genéticas do sistema da NADPH oxidase. O distúrbio é causado por mutações dos genes que codificam os quatro polipeptídeos que constituem o sistema da NADPH oxidase. Alguns pacientes respondem ao tratamento com interferon gama, que pode aumentar a transcrição do componente de 91-kDa, se estiver afetado. Esforços estão sendo envi-

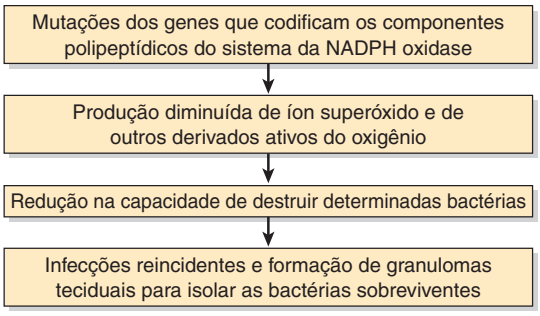


FIGURA 52-8 Esquema simplificado da sequência de eventos envolvidos na etiologia da doença granulomatosa crônica (OMIM 306400). A doença pode ser causada por mutações de qualquer um dos genes dos quatro polipeptídeos envolvidos (dois constituem componentes do citocromo b_{558}, enquanto os outros dois derivam do citoplasma). O polipeptídeo de 91 kDa é codificado por um gene localizado no cromossomo X; cerca de 60% dos casos de doença granulomatosa crônica estão ligados ao X, enquanto o restante é herdado como traço autossômico recessivo.

dados para desenvolver uma terapia gênica para essa doença. A **Figura 52-8** ilustra a provável sequência de eventos envolvidos na etiologia da doença granulomatosa crônica.

Os neutrófilos contêm mieloperoxidase, a qual catalisa a produção de oxidantes clorados

A enzima **mieloperoxidase**, que está presente nos grânulos dos neutrófilos em grandes quantidades, é responsável pela coloração esverdeada do pus e pode atuar sobre o H_2O_2 para produzir ácidos hipo-halosos.

$$H_2O_2 + X^- + H^+ \xrightarrow{\text{MIELOPEROXIDASE}} HOX + H_2O$$

($X^- = Cl^-, Br^-, I^-$ ou SCN^-; HOCl = ácido hipocloroso)

O H_2O_2 utilizado como substrato é gerado pelo sistema da NADPH oxidase. O Cl^- é o haleto geralmente utilizado, já que está presente em concentrações relativamente altas no plasma e nos líquidos corporais. O **HOCl**, o ingrediente ativo da água sanitária de uso doméstico, é um poderoso oxidante, altamente microbicida. Quando aplicado a tecidos normais, seu potencial de causar dano encontra-se diminuído, pois reage com aminas primárias ou secundárias presentes nos neutrófilos e nos tecidos, formando diversos derivados de nitrogênio-cloro; essas **cloraminas** também são oxidantes, embora sejam menos potentes do que HOCl, e atuem como agentes microbicidas (p. ex., na esterilização de feridas), sem causar lesão tecidual.

As proteinases dos neutrófilos podem causar grave lesão tecidual se as suas ações não forem controladas

Os neutrófilos contêm diversas proteinases (Tabela 52-13) que podem hidrolisar a elastina, vários tipos de colágenos e outras proteínas presentes na matriz extracelular. Essa ação enzimática, se não for impedida de prosseguir, pode resultar em grave lesão dos tecidos. Essas proteinases são, em sua maior parte, enzimas lisossomais e estão presentes principalmente na forma de precursores inativos nos neutrófilos normais. Ocorre liberação de pequenas quantidades dessas enzimas nos tecidos normais, porém suas concentrações aumentam acentuadamente durante a inflamação. Em condições normais, as atividades da elastase e de outras proteinases são mantidas sob controle por diversas antiproteinases (também relacionadas na Tabela 52-13) que estão presentes no plasma e no líquido extracelular. Cada uma delas pode combinar-se (com frequência, formando um complexo não covalente – com uma ou mais proteinases específicas, com consequente inibição. No Capítulo 50, foi mostrado que uma deficiência genética do inibidor da α1-antiproteinase (α1--antitripsina) permite a livre atuação da elastase, que digere o tecido pulmonar, participando, desta maneira, na etiologia do enfisema. A α2-macroglobulina é uma proteína plasmática que desempenha um importante papel na defesa do organismo contra a ação excessiva das proteases; ela se combina com diversas proteases importantes e, desse modo, neutraliza suas atividades (Capítulo 50).

TABELA 52-13 Proteinases dos neutrófilos e antiproteinases do plasma e dos tecidos[1]

Proteinases	Antiproteinases
Elastase	α_1-Antiproteinase (α_1-antitripsina)
Colagenase	α_2-Macroglobulina
Gelatinase	Inibidor da leucoproteinase secretória
Catepsina G	α_1-Antiquimotripsina
Ativador do plasminogênio	Inibidor do ativador do plasminogênio-1
	Inibidor tecidual da metaloproteinase

[1]A Tabela relaciona algumas das proteinases importantes dos neutrófilos e algumas das proteínas que podem inibir suas ações. As proteinases listadas ocorrem, em sua maioria, dentro dos neutrófilos na forma de precursores. As proteinases citadas podem digerir muitas proteínas da matriz extracelular, causando lesão tecidual. O equilíbrio global de ação das proteinases:antiproteinases pode ser alterado pela ativação dos precursores das proteinases ou pela inativação das antiproteinases. Esta última situação pode ser causada por degradação proteolítica ou modificação química, por exemplo, a Met-358 do inibidor α_1-antiproteinase é oxidada pela fumaça do cigarro.

Quando formados em quantidades aumentadas durante a inflamação, os oxidantes clorados afetam o equilíbrio entre proteinases e antiproteinases, favorecendo as primeiras. Por exemplo, algumas das proteinases listadas na Tabela 52-13 são **ativadas** pelo HOCl, enquanto algumas das antiproteinases são **inativadas** por esse composto. Além disso, o inibidor tecidual das metaloproteinases e da α-antiquimotripsina podem ser hidrolisados pela elastase ativada, e um inibidor da α_1-antiproteinase pode ser hidrolisado pela colagenase e gelatinase ativadas. Na maioria das situações, obtém-se um **equilíbrio apropriado** entre as proteinases e as antiproteinases. Todavia, em alguns casos, como nos pulmões quando há deficiência do inibidor da α_1-antiproteinase, ou quando ocorre acúmulo tecidual de grandes quantidades de neutrófilos em virtude de drenagem inadequada, pode ocorrer **lesão tecidual** considerável, devido à ação não restrita das proteinases.

A TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE TEVE UM ENORME IMPACTO NA HEMATOLOGIA

A **tecnologia do DNA recombinante** teve grande impacto sobre muitos aspectos da hematologia. As bases das **talassemias** e de muitos **distúrbios da coagulação** (Capítulo 51) foram amplamente esclarecidas por pesquisas que utilizaram a clonagem e o sequenciamento. O estudo dos oncogenes e das translocações cromossômicas ampliou os conhecimentos sobre as **leucemias**. Conforme discutido anteriormente, as técnicas de clonagem permitiram a disponibilidade de quantidades terapêuticas de **eritropoietina** e **outros fatores de crescimento**. A deficiência de **adenosina desaminase**, que afeta particularmente os linfócitos, constitui a primeira doença a ser tratada com terapia gênica (ver Caso nº 1, Capítulo 57). À semelhança de muitas outras áreas da biologia e da medicina, a hematologia foi e continua sendo revolucionada por essa tecnologia. A **biologia de sistemas** é outra abordagem que está começando a ser aplicada às hematopoieses normal e anormal. Depende, em grande parte, de ferramentas da matemática, engenharia e computação para uma maior compreensão dos processos biológicos complexos, como a hematopoiese. Os avanços na genômica e na proteômica também são fundamentais para o seu futuro desenvolvimento.

RESUMO

- Alguns tipos de anemias são distúrbios muito prevalentes. As principais causas de anemia consistem em perda de sangue, deficiência de ferro, folato e vitamina B_{12} e vários fatores que causam hemólise.
- O eritrócito possui estrutura e função simples e consiste principalmente em uma solução concentrada de hemoglobina circundada por uma membrana.
- A produção dos eritrócitos é regulada pela eritropoietina, enquanto outros fatores de crescimento (p. ex., os fatores de estimulação de colônias de granulócitos e de colônias de granulócitos-macrófagos) regulam a produção dos leucócitos.
- O eritrócito contém um conjunto de enzimas citosólicas, como a superóxido dismutase, a catalase e a glutationa peroxidase, para a eliminação dos oxidantes potentes (ROS) gerados durante o seu metabolismo.
- A deficiência geneticamente determinada da atividade da glicose-6-fosfato-desidrogenase, que produz NADPH, constitui uma causa importante de anemia hemolítica.
- A metemoglobina é incapaz de transportar o oxigênio; são reconhecidas causas tanto genéticas quanto adquiridas de metemoglobinemia.
- Existem informações consideráveis a respeito das proteínas e dos lipídeos da membrana eritrocitária. Várias proteínas do citoesqueleto, como a espectrina, a anquirina e a actina, interagem com proteínas de membrana integrais e específicas para ajudar a regular o formato e a flexibilidade da membrana.
- A deficiência de espectrina resulta em esferocitose hereditária e eliptocitose hereditária, e ambas causam anemia hemolítica.
- As substâncias do grupo sanguíneo ABO na membrana eritrocitária consistem em glicoesfingolipídeos complexos; o açúcar imunodominante da substância A é a *N*-acetil-galactosamina, enquanto o da substância B é a galactose. A substância O não contém esses dois resíduos de açúcar nas ligações particulares encontradas nas substâncias A e B.
- Os neutrófilos desempenham um papel importante nos mecanismos de defesa do organismo. As integrinas presentes em suas membranas superficiais determinam interações específicas com vários componentes celulares e teciduais.
- Os leucócitos são ativados com a sua exposição a bactérias e a outros estímulos; a NADPH oxidase desempenha um papel fundamental no processo de ativação (explosão respiratória). As mutações dessa enzima e de proteínas associadas causam a doença granulomatosa crônica.
- As proteinases dos neutrófilos podem digerir muitas proteínas teciduais; em condições normais, são mantidas sob controle por um conjunto de antiproteinases. Todavia, esse mecanismo de defesa pode ser superado em determinadas circunstâncias, resultando em lesão tecidual extensa.
- A aplicação da tecnologia do DNA recombinante está revolucionando o campo da hematologia.

REFERÊNCIAS

Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, et al (editors): *Harrison's Principles of Internal Medicine,* 17th ed. McGraw-Hill, 2008. (Chapters 58, 61, & 98–108 deal with various blood disorders. Chapters 66–68 deal with various aspects of hematopoietic and other stem cells).

Hofmann R, Benz Jr EJ, Shattal SJ, et al (editors): *Hematology: Basic Principles and Practice,* 4th ed. Elsevier Churchill Livingston, 2005.

Imlay JA: Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. Annu Rev Biochem 2008;77:755.

Israels SJ (editor): *Mechanisms in Hematology,* 4th 3rd ed. Core Health Sciences Inc, 2011.

Naria A, Ebert BL: Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. Blood 2010;115:3196.

Orkin SH, Higgs DR: Sickle cell disease at 100 years. Science 2010;329:291.

Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, et al (editors): *The Molecular Bases of Inherited Disease,* 8th ed. McGraw-Hill, 2001. (This text is now available online and updated as *The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease* at www.ommbid.com Subscription is required, although access may be available via university and hospital libraries and other sources). A number of the chapters concern topics described in this chapter.

van den Berg JM, van Koppen E, Ahlin A, et al: Chronic granulomatous disease: the European experience. PLoS ONE 2009;4:e5234.

Weatherall DJ: The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health problem. Blood 2010;115:4331.

Whichard ZL, Sarkar CA, Kimmel M, Corey SJ: Hematopoiesis and its disorders: a systems biology approach. Blood 2010;115:2339.

Yonekawa K, Harlan JM: Targeting leukocyte integrins in human diseases. J Leukoc Biol 2005;77:129.

CAPÍTULO

53

Metabolismo dos Xenobióticos

Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Discutir sobre como os fármacos e outros xenobióticos são metabolizados no corpo.
- Descrever as duas fases gerais do metabolismo dos xenobióticos, das quais a primeira envolve principalmente reações de hidroxilação catalisadas por espécies do citocromo P450, enquanto a segunda consiste em reações de conjugação catalisadas por diversas enzimas.
- Indicar a importância metabólica da glutationa.
- Reconhecer que os xenobióticos podem causar efeitos farmacológicos, tóxicos, imunológicos e carcinogênicos.
- Compreender como o conhecimento da farmacogenômica deve ajudar a personalizar o uso dos fármacos.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Os seres humanos estão cada vez mais sujeitos à exposição a diversas substâncias químicas estranhas (**xenobióticos**) — fármacos, aditivos alimentares, poluentes, etc. A situação foi bem resumida na seguinte citação de Rachel Carson: "Como uma arma tão bruta quanto a clava do homem das cavernas, a artilharia química foi lançada contra a essência da vida." **A compreensão do modo pelo qual os xenobióticos são processados em nível celular** é importante para aprender a enfrentar os ataques químicos e, assim, ajudar a **preservar o meio ambiente**. Por exemplo, com base nessas informações, foram envidados esforços para modificar os microrganismos com a introdução de genes que codificam várias enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos específicos e transformá-los em produtos inócuos. Esses microrganismos modificados serão então utilizados para ajudar a eliminar vários poluentes que contaminam o planeta.

O conhecimento do metabolismo dos xenobióticos é fundamental para uma compreensão racional da farmacologia e da terapia, da farmácia, da toxicologia, do tratamento do câncer e da dependência de drogas. Todas essas áreas envolvem a administração ou a exposição a xenobióticos.

OS SERES HUMANOS ENTRAM EM CONTATO COM MILHARES DE XENOBIÓTICOS QUE PRECISAM SER METABOLIZADOS ANTES DE SEREM EXCRETADOS

O **xenobiótico** (do grego *xenos,* estranho) é um composto químico estranho ao corpo. As principais classes de xenobióticos de importância médica são os **fármacos**, os **carcinógenos químicos** e **vários compostos** que são liberados do ambiente de uma forma ou de outra, como as bifenilas policloradas (PCB) e determinados inseticidas. Existem mais de 200.000 substâncias químicas ambientais produzidas. Esses compostos são, em sua maioria, metabolizados (i.e., sofrem alteração química) no corpo humano, e o fígado é o principal órgão envolvido nesse processo; em certas ocasiões, o xenobiótico pode ser excretado em sua forma inalterada. Pelo menos **30 tipos diferentes de enzimas** catalisam reações envolvidas no metabolismo dos xenobióticos. Todavia, este capítulo só irá descrever um grupo selecionado dessas enzimas.

É conveniente considerar o metabolismo dos xenobióticos em duas fases. Na **fase 1**, a principal reação envolvida é a **hidroxilação**, que é catalisada principalmente por membros de uma

classe de enzimas conhecidas como **monoxigenases** ou sistema enzimático do **citocromo P450**. A hidroxilação pode interromper a ação de um fármaco, embora isso nem sempre ocorra. Além da hidroxilação, essas enzimas catalisam uma **ampla variedade de reações**, inclusive as que envolvem desaminação, desalogenação, dessulfatação, epoxidação, peroxigenação e redução. As reações que envolvem a hidrólise (p. ex., catalisadas por esterases) e várias outras reações não catalisadas pelo citocromo P450 também ocorrem na fase 1.

Na **fase 2**, os compostos hidroxilados, ou outros compostos produzidos na fase 1, são convertidos por enzimas específicas em **vários metabólitos polares** por **conjugação** com ácido glicurônico, sulfato, acetato, glutationa ou certos aminoácidos, ou por **metilação**.

O propósito final das duas fases do metabolismo dos xenobióticos consiste em aumentar a sua **hidrossolubilidade** (**polaridade**) e, por conseguinte, a sua **excreção** do corpo. Os xenobióticos muito hidrofóbicos permaneceriam quase indefinidamente no tecido adiposo se não fossem convertidos em formas mais polares. Em alguns casos, as reações metabólicas da fase 1 convertem os xenobióticos **inativos** em compostos **biologicamente ativos**. Nesses casos, os xenobióticos originais são conhecidos como "**pré-fármacos**" ou "**pró-carcinógenos**". Em outros casos, reações adicionais da fase 1 (p. ex., reações adicionais de hidroxilação) convertem os compostos ativos em formas menos ativas ou inativas antes da conjugação. Em outros casos ainda, as próprias reações de conjugação convertem os produtos ativos das reações da fase 1 em espécies menos ativas ou inativas, que são subsequentemente excretadas na urina ou na bile. Em pouquíssimos casos, a conjugação pode realmente aumentar a atividade biológica de um xenobiótico.

O termo "**destoxificação**" é ocasionalmente empregado para descrever muitas das reações envolvidas no metabolismo dos xenobióticos. Contudo, esse termo nem sempre é apropriado, visto que, conforme assinalado anteriormente, em algumas ocasiões, as reações às quais os xenobióticos são submetidos **aumentam**, na verdade, a sua atividade biológica e toxicidade.

AS ISOFORMAS DO CITOCROMO P450 HIDROXILAM INÚMEROS XENOBIÓTICOS NA FASE 1 DE SEU METABOLISMO

A **hidroxilação** constitui a principal reação envolvida na fase 1. As enzimas responsáveis são conhecidas como **monoxigenases** ou enzimas do **citocromo P450**. De acordo com as estimativas, existem cerca de 57 genes do citocromo P450 nos seres humanos. A reação catalisada por uma monoxigenase (citocromo P450) é a seguinte:

$$RH + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow R\text{-}OH + H_2O + NADP$$

O RH pode representar uma variedade muito grande de xenobióticos, incluindo fármacos, carcinógenos, pesticidas, produtos derivados do petróleo e poluentes (p. ex., mistura de PCB). Além disso, os **compostos endógenos**, como alguns esteroides, eicosanoides, ácidos graxos e retinoides, também são substratos. Em geral, os substratos são **lipofílicos** e são transformados em compostos mais **hidrofílicos** por hidroxilação.

O citocromo P450 é considerado o **biocatalisador mais versátil** conhecido. O verdadeiro mecanismo de reação é complexo e já foi descrito de modo sucinto (Figura 12-6). Foi constatado, com o uso do $^{18}O_2$, que um átomo de oxigênio entra no R-OH e o outro vai para a água. Esse duplo destino do oxigênio explica a antiga designação das monoxigenases como "**oxidases de função mista**". A reação catalisada pelo citocromo P450 pode ser representada da seguinte maneira:

Citocromo P450 reduzido → Citocromo P450 oxidado

$$RH + O_2 \rightarrow R{-}OH + H_2O$$

O citocromo P450 é assim designado porque a enzima foi descoberta quando se observou que preparações de **microssomos** que tinham sido reduzidas quimicamente e, em seguida, expostas ao monóxido de carbono **exibiam um pico distinto em 450 nm**. Os microssomos contêm fragmentos do retículo endoplasmático, onde grande parte do conteúdo do citocromo P450 das células está localizado (ver adiante). Entre as razões pelas quais essa enzima é importante destaca-se o fato de que **aproximadamente 50% dos fármacos comuns ingeridos pelos seres humanos são metabolizados por isoformas do citocromo P450**; essas enzimas também atuam sobre vários carcinógenos e poluentes. Os principais citocromos P450 envolvidos no metabolismo dos fármacos são membros das famílias CYP1, CYP2 e CYP3 (ver adiante).

As isoformas do citocromo P450 constituem uma superfamília de enzimas que contêm heme

No que concerne às enzimas do citocromo P450, as seguintes considerações são importantes.

1. Em virtude do **grande número de isoformas** (cerca de 150) que foram descobertas, tornou-se importante formular uma **nomenclatura sistemática** para as isoformas do P450 e seus genes. Atualmente, essa nomenclatura está disponível e amplamente utilizada e baseia-se na homologia estrutural. O símbolo-raiz abreviado CYP denota um citocromo P450. Essa abreviatura é seguida por um algarismo arábico que designa a **família**; os citocromos P450 são incluídos na mesma família se exibirem uma identidade de 40% ou mais na sequência de aminoácidos. O algarismo arábico é seguido de uma letra maiúscula que indica a **subfamília**, se houver dois ou mais membros; os citocromos P450 são reunidos na mesma subfamília se exibirem uma identidade de sequência maior que 55%. Em seguida, os citocromos P450 **individuais** recebem algarismos arábicos arbitrariamente. Assim, a CYP1A1 indica um citocromo P450 que é membro da família 1 e da subfamília A, tendo sido o primeiro membro identificado dessa subfamília. A nomenclatura para os **genes** que codificam os citocromos P450 é idêntica àquela descrita anteriormente, exceto pelo fato de que os símbolos estão em itálico; por conseguinte, o gene que codifica a enzima CYP1A1 é o *CYP1A1*.

2. À semelhança da **hemoglobina**, essas enzimas são hemoproteínas.

3. Os citocromos **estão** amplamente distribuídos entre as espécies, **inclusive** em **bactérias**.

4. Essas enzimas estão presentes em quantidades maiores nos hepatócitos e nos enterócitos, porém são provavelmente encontradas em todos os tecidos. No fígado e na maioria dos outros tecidos, elas estão localizadas principalmente nas **membranas do retículo endoplasmático liso**, que constituem parte da **fração microssomal**, quando o tecido é submetido a **fracionamento subcelular**. Nos microssomos hepáticos, os citocromos P450 podem constituir até 20% das proteínas totais. Essas enzimas são encontradas na maioria dos tecidos, embora frequentemente em quantidades pequenas em comparação com as quantidades encontradas no fígado. Na **suprarrenal**, os citocromos P450 são encontrados nas **mitocôndrias**, bem como no retículo endoplasmático; as diversas hidroxilases presentes nesse órgão desempenham um importante papel na biossíntese do colesterol e dos esteroides. O sistema do citocromo P450 mitocondrial difere do sistema microssomal, visto que ele utiliza uma flavoproteína ligada ao NADPH, a **adrenodoxina redutase**, e uma proteína não heme contendo ferro-enxofre, a **adrenodoxina**. Além disso, as isoformas P450 específicas envolvidas na biossíntese dos esteroides são, em geral, muito mais restritas na sua especificidade pelos substratos.

5. No retículo endoplasmático do fígado humano, existem pelo menos seis espécies diferentes de citocromo P450, cada uma delas com **especificidades de substrato** amplas e ligeiramente superpostas, com atuação tanto nos xenobióticos quanto em compostos endógenos. Nos últimos anos, os genes de muitas isoformas do citocromo P450 (tanto nos seres humanos quanto em animais, como o rato) foram isolados e estudados detalhadamente. A existência de **diversos tipos de genes associada ao fato de que cada uma das enzimas exibe uma especificidade de substrato relativamente ampla** explica por que a família do citocromo P450 é capaz de metabolizar milhares de substâncias químicas diferentes.

6. O **NADPH**, e não o NADH, está envolvido no mecanismo de reação do citocromo P450. A enzima que utiliza o NADPH para produzir o citocromo P450 reduzido, mostrada no lado esquerdo da equação apresentada anteriormente, é denominada **NADPH-citocromo P450 redutase**. Os elétrons são transferidos do NADPH para a NADPH-citocromo P450 redutase e, em seguida, para o citocromo P450. Isso resulta na **ativação redutora do oxigênio molecular**, e, posteriormente, um átomo de oxigênio é inserido no substrato. O **citocromo b_5**, outra hemoproteína encontrada nas membranas do reticulo endoplasmático liso (Capítulo 12), pode estar envolvido como doador de elétrons em alguns casos.

7. Os **lipídeos** também são componentes do sistema do citocromo P450. O preferido é a **fosfatidilcolina**, que é o principal lipídeo encontrado nas membranas do retículo endoplasmático.

8. As isoformas do citocromo P450 são, em sua maioria, **induzíveis**. Por exemplo, a administração de fenobarbital ou de muitos outros fármacos provoca hipertrofia do retículo endoplasmático liso e um aumento de 3 a 4 vezes na quantidade de citocromo P450 dentro de 4 a 5 dias. O mecanismo da indução foi estudado extensamente e, na maioria dos casos, envolve um **aumento da transcrição do mRNA** do citocromo P450. Entretanto, alguns casos de indução envolvem a **estabilização do mRNA**, a **estabilização da enzima ou outros mecanismos** (p. ex., um efeito na tradução).

A indução do citocromo P450 tem implicações clínicas importantes, uma vez que se trata de um mecanismo bioquímico de **interação farmacológica**. Uma interação farmacológica ocorre quando os efeitos de determinado fármaco são alterados pela administração prévia, simultânea ou subsequente de outro fármaco. Por exemplo, supõe-se uma situação em que um paciente está em uso do anticoagulante **varfarina** para impedir a coagulação do sangue. Esse fármaco é metabolizado pelo **CYP2C9**. Concomitantemente, o paciente começa a tomar **fenobarbital** (um indutor desse P450) para tratamento de algum tipo de epilepsia, porém a dose de varfarina não é modificada. Depois de 5 dias, aproximadamente, o nível de CYP2C9 no fígado do paciente estará aumentado de três a quatro vezes. Por sua vez, isso significa que a varfarina será **metabolizada muito mais rapidamente do que antes**, e a sua **dose se tornará inadequada**. Assim, **a dose precisa ser aumentada** para que a varfarina seja terapeuticamente efetiva. Para prosseguir com este mesmo exemplo, pode surgir posteriormente um **problema** se o **fenobarbital for interrompido** e a dose aumentada de varfarina for mantida. O paciente irá correr risco de sangramento, visto que a dose alta de varfarina será ainda mais ativa do que antes, pois o nível de CYP2C9 irá declinar após a interrupção do fenobarbital.

Outro exemplo de indução enzimática envolve o **CYP2E1**, que é induzido pelo consumo de **etanol**. Esse fato é preocupante, já que esse citocromo P450 metaboliza alguns solventes amplamente usados, bem como componentes encontrados na fumaça do tabaco, muitos dos quais são **carcinógenos** comprovados. Então, se a atividade do CYP2E1 for aumentada por indução, poderá aumentar o risco de desenvolvimento de carcinogenicidade com a exposição a esses compostos.

9. Algumas isoformas do citocromo P450 (**p. ex.**, **CYP1A1**) estão envolvidas particularmente no metabolismo dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) e moléculas relacionadas; por esse motivo, eram anteriormente denominadas **hidroxilases de hidrocarbonetos aromáticos** (**AHH**). Essa enzima é importante no metabolismo dos PAH, bem como na carcinogênese produzida por esses agentes. Por exemplo, nos pulmões, essas enzimas podem estar envolvidas na conversão dos PAH inativos (pró-carcinógenos), inalados pela fumaça, em carcinógenos ativos por reações de hidroxilação. Os fumantes apresentam níveis mais elevados dessa enzima em algumas de suas células e tecidos, em comparação com os indivíduos que não fumam. Alguns estudos indicaram que a atividade dessa enzima pode estar elevada (induzida) na **placenta** de uma mulher fumante, alterando potencialmente as quantidades de metabólitos dos PAH (alguns dos quais poderiam ser deletérios) aos quais o feto fica exposto.

10. Alguns citocromos P450 ocorrem em **formas polimórficas** (isoformas genéticas), das quais algumas exibem baixa atividade catalítica. Essas observações fornecem uma importante explicação para as variações das respostas a fármacos observadas em muitos pacientes. Um citocromo P450 que exibe polimorfismo é o **CYP2D6**, que está envolvido no metabolismo da **debrisoquina** (fármaco anti-hipertensivo; ver Tabela 53-2) e da **esparteína** (fármaco antiarrítmico e ocitócico). Certos polimorfismos de CYP2D6 resultam em metabolismo deficiente desses e de uma variedade de outros fármacos, de modo a acumularem-

-se no organismo, resultando em consequências deletérias. Outro polimorfismo interessante é o **CYP2A6** que está envolvido no metabolismo da **nicotina** em conitina. Foram identificados três alelos *CYP2A6*: um tipo selvagem e dois alelos nulos ou inativos. Foi relatado que os indivíduos com alelos nulos, que apresentam comprometimento do metabolismo da nicotina, são aparentemente protegidos de se tornarem fumantes dependentes de tabaco (Tabela 53-2). Esses indivíduos fumam menos, presumivelmente por que as concentrações sanguíneas e cerebrais permanecem elevadas por mais tempo do que as dos indivíduos com alelo tipo selvagem. Foi sugerido que a inibição de CYP2A6 pode constituir uma nova abordagem para ajudar a impedir e a tratar o tabagismo.

A **Tabela 53-1** fornece um resumo de algumas características principais do citocromo P450.

TABELA 53-1 Algumas propriedades dos citocromos P450

• Estão envolvidos na fase 1 do metabolismo de inúmeros xenobióticos, incluindo talvez 50% dos fármacos administrados aos seres humanos; podem aumentar, diminuir e não afetar as atividades de vários fármacos.
• Estão envolvidos no metabolismo de muitos compostos endógenos (p. ex., esteroides).
• Todos são hemoproteínas.
• Com frequência, exibem ampla especificidade de substrato, atuando, assim, em numerosos compostos; consequentemente, diferentes citocromos P450 podem catalisar a formação do mesmo produto.
• São catalisadores extremamente versáteis, catalisando, talvez, cerca de 60 tipos de reações.
• Entretanto, eles basicamente catalisam reações que envolvem a introdução de um átomo de oxigênio no substrato e outro na água.
• Seus produtos hidroxilados são mais hidrossolúveis do que seus substratos geralmente lipofílicos, facilitando a excreção.
• O fígado contém as maiores quantidades; todavia, são encontrados na maioria, senão em todos os tecidos, inclusive no intestino delgado, no cérebro e nos pulmões.
• Estão localizados no reticulo endoplasmático liso ou nas mitocôndrias (hormônios esteroidogênicos).
• Em alguns casos, seus produtos são mutagênicos ou carcinogênicos.
• Muitos apresentam uma massa molecular de cerca de 55 kDa.
• Muitos são induzíveis, resultando em uma causa das interações medicamentosas.
• Muitos são inibidos por vários fármacos ou por seus produtos metabólicos, constituindo outra causa de interações medicamentosas.
• Alguns exibem polimorfismos genéticos, que podem resultar em metabolismo farmacológico atípico.
• Suas atividades podem estar alteradas em tecidos doentes (p. ex., cirrose), afetando o metabolismo dos fármacos.
• No futuro, a genotipagem do perfil de citocromos P450 dos pacientes (p. ex., para detectar polimorfismos) poderá permitir a individualização do tratamento farmacológico.

AS REAÇÕES DE CONJUGAÇÃO PREPARAM OS XENOBIÓTICOS PARA A SUA EXCREÇÃO NA FASE 2 DE SEU METABOLISMO

Nas reações da fase 1, os xenobióticos são geralmente convertidos em derivados hidroxilados mais polares. Nas reações da fase 2, esses derivados são conjugados com moléculas, como o ácido glicurônico, o sulfato e a glutationa. Isso os torna ainda mais hidrossolúveis, sendo finalmente excretados na urina ou na bile.

A seguir, são descritos cinco tipos de reações da fase 2

Glicuronidação

A glicuronidação da bilirrubina é discutida no Capítulo 31; as reações pelas quais os xenobióticos sofrem glicuronidação são essencialmente semelhantes. O UDP-ácido glicurônico é o doador de glicuronil, e os catalisadores são constituídos por uma variedade de glicuronil transferases presentes tanto no retículo endoplasmático quanto no citosol. Moléculas como o 2-acetilaminofluoreno (um carcinógeno), a anilina, o ácido benzoico, o mefrobamato (um tranquilizante), o fenol e muitos esteroides são excretadas na forma de glicuronídeos. O glicuronídeo pode estar ligado ao oxigênio, ao nitrogênio ou a grupos com enxofre dos substratos. A glicorunidação constitui, provavelmente, a reação de conjugação mais frequente.

Sulfatação

Alguns alcoóis, as arilaminas e os fenóis são sulfatados. O **doador de sulfato** nessas reações e em outras reações de sulfatação biológicas (p. ex., sulfatação dos esteroides, dos glicosaminoglicanos, dos glicolipídeos e das glicoproteínas) é o **adenosina-3′-fosfato-5′fosfossulfato** (**PAPS**) (Capítulo 24); esse composto é denominado "sulfato ativo".

Conjugação com glutationa

A glutationa (γ-glutamilcisteinilglicina) é um **tripeptídeo** que consiste em ácido glutâmico, cisteína e glicina (Figura 3-3). A glutationa costuma ser abreviada como GSH (devido ao grupo sulfidrila de sua cisteína, que constitui a parte ativa da molécula). Diversos xenobióticos eletrofílicos potencialmente tóxicos (como determinados carcinógenos) são conjugados com a GSH nucleofílica em reações que podem ser representadas da seguinte maneira:

$$R + GSH \rightarrow R - S - G$$

Onde R = um xenobiótico eletrofílico. As enzimas que catalisam essas reações são denominadas **glutationa-*S*-transferases** e estão presentes em grandes quantidades no citosol dos hepatócitos e em quantidades menores em outros tecidos. Nos tecidos dos seres humanos, existe uma variedade de glutationa-*S*-transferases, elas exibem diferentes especificidades de substrato e podem ser separadas por eletroforese ou por outras técnicas. Se os xenobióticos potencialmente tóxicos não fossem conjugados com a GSH, estariam livres para se combinar de modo covalente com o DNA, o RNA ou com proteínas celulares, podendo resultar, assim, em grave lesão celular. Portanto, a GSH constitui um

importante **mecanismo de defesa** contra determinados compostos tóxicos, como alguns fármacos e carcinógenos. Se os níveis de GSH de um tecido, como o fígado, forem **reduzidos** (como, por exemplo, com a administração de alguns compostos para ratos que reagem a GSH), esse tecido pode ficar mais suscetível à lesão por várias substâncias químicas que normalmente seriam conjugadas com a GSH. Os conjugados de glutationa estão **sujeitos a metabolismo** subsequente antes de sua excreção. Os grupos glutamil e glicinil, que pertencem à glutationa, são removidos por enzimas específicas, e um grupo acetil (doado pela acetil-CoA) é acrescentado ao grupo amino da fração cisteinil remanescente. O composto resultante é um **ácido mercaptúrico**, um conjugado da L-acetilcisteína, que é então excretada na urina.

A glutationa desempenha outras funções importantes nas células humanas, além de seu papel no metabolismo dos xenobióticos.

1. Participa na decomposição do **peróxido de hidrogênio** potencialmente tóxico, na reação catalisada pela glutationa peroxidase (Capítulo 21).
2. É um importante **redutor intracelular e antioxidante**, que ajuda a manter os grupos SH essenciais das enzimas em seu estado reduzido. Essa função é discutida no Capítulo 21, e a sua participação na anemia hemolítica causada pela deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase é descrita nos Capítulos 21 e 52.
3. Um ciclo metabólico que envolve a GSH como carreador foi implicado no **transporte de determinados aminoácidos** através das membranas no rim. A primeira reação no ciclo é apresentada a seguir.

$$\text{Aminoácido} + \text{GSH} \rightarrow \gamma\text{-Glutamil aminoácido} + \text{Cisteinilglicina}$$

Essa reação ajuda a transferir determinados aminoácidos através da membrana plasmática, e o aminoácido é subsequentemente hidrolisado de seu complexo com a GSH, com nova síntese de GSH a partir da cisteinilglicina. A enzima que catalisa a reação anteriormente descrita é a **γ-glutamiltransferase** (**GGT**). Essa enzima está presente na membrana plasmática das células tubulares renais e nas células dos ductos biliares, bem como no retículo endoplasmático dos hepatócitos. A enzima tem valor diagnóstico, visto que é liberada no sangue pelos hepatócitos em **várias doenças hepatobiliares**.

Outras reações

As outras duas reações mais importantes são a acetilação e a metilação.

1. **Acetilação** — A acetilação é representada pela seguinte fórmula:

$$\text{X} + \text{Acetil-CoA} \rightarrow \text{Acetil-X} + \text{CoA}$$

Onde X representa um xenobiótico. À semelhança de outras reações de acetilação, a **acetil-CoA** (acetato ativo) é o doador de acetil. Essas reações são catalisadas por **acetiltransferases** presentes no citosol de vários tecidos, particularmente do fígado. A **isoniazida**, fármaco usado no tratamento da tuberculose, é submetida à acetilação. Existem **tipos polimórficos** de acetiltransferases, de modo que os indivíduos são classificados em **acetiladores lentos ou rápidos**, visto que esses tipos influenciam a taxa de depuração de fármacos como a isoniazida do sangue. Os acetiladores lentos estão mais sujeitos a determinados efeitos tóxicos da isoniazida, pois esse fármaco persiste por mais tempo nesses indivíduos.

2. **Metilação** — Alguns xenobióticos sofrem metilação por metiltransferases, utilizando a *S*-adenosilmetionina (Figura 29-18) como doador de metila.

AS ATIVIDADES DAS ENZIMAS QUE METABOLIZAM OS XENOBIÓTICOS SÃO AFETADAS PELA IDADE, PELO SEXO E POR OUTROS FATORES

Vários fatores influenciam as atividades das enzimas que metabolizam os xenobióticos. As atividades dessas enzimas podem diferir de modo substancial entre as **espécies**. Assim, por exemplo, a possível **toxicidade** ou **carcinogenicidade** dos xenobióticos não pode ser diretamente extrapolada de uma espécie para outra. Existem diferenças significativas nas atividades enzimáticas entre os indivíduos, muitas das quais parecem ser o resultado de **fatores genéticos**. As atividades de algumas dessas enzimas variam de acordo com a **idade** e o **sexo**.

A ingestão de vários xenobióticos, como o fenobarbital, as PCB ou alguns hidrocarbonetos, pode causar **indução enzimática**. Por isso, é importante saber se um indivíduo foi exposto ou não a esses agentes indutores quando é avaliado em respostas bioquímicas aos xenobióticos. (É sempre importante, durante a obtenção da anamnese, perguntar se o paciente tomou qualquer fármaco ou outra preparação farmacêutica). Os metabólitos de alguns xenobióticos podem **inibir** ou **estimular** as atividades das enzimas que metabolizam esses compostos. Nesse caso também, isso pode afetar as doses de alguns fármacos administrados a pacientes. Várias **doenças** (p. ex., cirrose hepática) podem afetar as atividades das enzimas envolvidas no metabolismo dos fármacos, exigindo, algumas vezes, o ajuste das doses de vários medicamentos utilizados por pacientes com esses distúrbios.

AS RESPOSTAS AOS XENOBIÓTICOS INCLUEM EFEITOS FARMACOLÓGICOS, TÓXICOS, IMUNOLOGICOS E CARCINOGÊNICOS

Os xenobióticos são metabolizados no organismo pelas reações descritas anteriormente. Quando o xenobiótico é um fármaco, as reações da fase 1 podem produzir a sua forma ativa, ou podem diminuir ou suprimir a sua ação, caso ele seja farmacologicamente ativo no corpo sem metabolismo prévio. Os diversos efeitos produzidos pelos fármacos constituem o campo de estudo da farmacologia. Nesse ponto, é importante reconhecer que os fármacos atuam principalmente por mecanismos bioquímicos. A **Tabela 53-2** fornece um resumo de quatro reações importantes para os fármacos, que refletem **diferenças geneticamente determinadas** na estrutura das enzimas e das proteínas nos indi-

TABELA 53-2 Algumas reações medicamentosas importantes devido a formas mutantes ou polimórficas das enzimas ou das proteínas[1]

Enzima ou proteína afetada	Reação ou consequência
Glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) [mutações] (OMIM 305900)	Anemia hemolítica após a ingestão de fármacos como a primaquina
Canal de liberação do Ca^{2+} (receptor de rianodina) no retículo sarcoplasmático [mutações] (OMIM 180901)	Hipertermia maligna (OMIM 145600) após a administração de determinados anestésicos (p. ex., halotano)
CYP2D6 [polimorfismos] (OMIM 124030)	Metabolismo lento de determinados fármacos (p. ex., debrisoquina) resultando em seu acúmulo
CYP2A6 [polimorfismos] (OMIM 122720)	Comprometimento do metabolismo da nicotina, resultando em proteção para que o indivíduo não se torne dependente de tabaco

[1] A deficiência de G6PD é discutida nos Capítulos 21 e 52, e a hipertermia maligna no Capítulo 49. Além do gene que codifica o receptor de rianodina, pelo menos outro gene está envolvido em determinados casos de hipertermia maligna. Existem muitos outros exemplos de reações farmacológicas baseadas em polimorfismo ou mutação.

víduos — campo de estudo conhecido como **farmacogenética**. Essa área da ciência foi definida como **o estudo da contribuição dos fatores genéticos na variação da resposta aos fármacos e sua toxicidade**.

Os **polimorfismos** que afetam o metabolismo dos fármacos podem ocorrer em qualquer uma das **enzimas** envolvidas no seu metabolismo (incluindo o citocromo P450), assim como nos **transportadores** e nos **receptores**.

Alguns xenobióticos são muito tóxicos, mesmo em baixos níveis (p. ex., cianeto). Por outro lado, existem alguns xenobióticos, inclusive fármacos, que não exercem efeitos tóxicos quando administrados em quantidades suficientes. Os **efeitos tóxicos dos xenobióticos** cobrem um amplo espectro, porém os principais podem ser classificados em três categorias gerais (**Figura 53-1**).

Em primeiro lugar está a **lesão celular** (citotoxidade), que pode ser severa o suficiente para resultar em morte da célula. Existem muitos mecanismos pelos quais os xenobióticos causam lesão das células. O mecanismo considerado aqui é a **ligação covalente a macromoléculas celulares** de espécies reativas de xenobióticos produzidas pelo metabolismo. Esses alvos macromoleculares incluem **DNA**, **RNA** e **proteínas**. Se a macromolécula à qual o xenobiótico reativo se liga for essencial para a sobrevida a curto prazo da célula, como, por exemplo, uma proteína ou enzima envolvida em alguma função celular crítica, como a fosforilação oxidativa ou a regulação da permeabilidade da membrana plasmática, os efeitos severos sobre a função celular podem tornar-se evidentes com muita rapidez.

Em segundo lugar, as espécies reativas de um xenobiótico podem ligar-se a uma proteína, alterando a sua **antigenicidade**. Neste caso, o xenobiótico atua como **hapteno**, isto é, uma molécula pequena que por si só não estimula a síntese de anticorpos, mas que combina com o anticorpo uma vez formado. Em seguida, os **anticorpos** resultantes podem lesionar a célula por diversos mecanismos imunológicos que perturbam visivelmente os processos bioquímicos celulares normais.

Em terceiro lugar, acredita-se que as reações das espécies ativadas dos carcinógenos químicos com o **DNA** sejam de grande importância na **carcinogênese química**. Alguns compostos químicos (p. ex., benzo[α]pireno) exigem a sua ativação pelas monoxigenases do retículo endoplasmático para se transformar em agentes carcinogênicos (razão pela qual são denominados **carcinógenos indiretos**). Por conseguinte, as atividades das monoxigenases e de outras enzimas que metabolizam os xenobióticos e que estão presentes no reticulo endoplasmático ajudam a determinar se esses compostos irão se transformar em agentes carcinogênicos ou serão "destoxificados". Outros compostos químicos (p. ex., vários agentes alquilantes) podem reagir diretamente (carcinógenos diretos com o DNA) sem sofrer ativação química intracelular.

A enzima **epóxido hidrolase** é de interesse, pois ela pode exercer um efeito protetor contra determinados carcinógenos. Os produtos da ação de determinadas monoxigenases sobre alguns

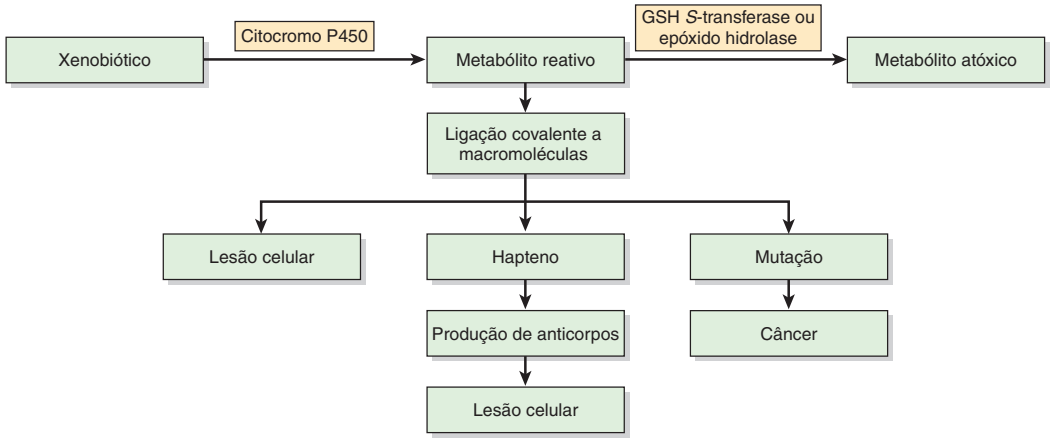
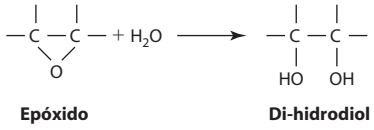


FIGURA 53-1 Esquema simplificado que demonstra como o metabolismo de um xenobiótico pode resultar em lesão celular, dano imunológico ou câncer. Neste caso, a conversão do xenobiótico em um metabólito ativo é catalisada por um citocromo P450, enquanto a conversão do metabólito reativo (p. ex., um epóxido) em metabólito atóxico é catalisada por uma GSH *S*-transferase ou por uma epóxido hidrolase.

substratos pró-carcinogênicos são **epóxidos**. Os epóxidos são altamente reativos e mutagênicos ou carcinogênicos, ou ambos. A epóxido hidrolase — à semelhança do citocromo P450, que também está presente nas membranas do reticulo endoplasmático — atua nesses compostos, convertendo-os em di-hidrodióis muito menos reativos. A reação catalisada pela epóxido hidrolase pode ser representada da seguinte maneira:



Epóxido **Di-hidrodiol**

A FARMACOGENÔMICA IRÁ PROMOVER O DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS NOVOS E MAIS SEGUROS

Conforme assinalado anteriormente, **a farmacogenética é o estudo da contribuição de vários fatores genéticos na variação da resposta aos fármacos e à toxicidade**. Como resultado dos progressos realizados no sequenciamento do genoma humano, surgiu recentemente uma nova área de estudo — **a farmacogenômica** — a qual foi definida **como o uso da informação e tecnologias genômicas para aperfeiçoar a descoberta e o desenvolvimento de alvos e fármacos**. Essa especialidade fundamenta-se na farmacogenética, porém cobre uma esfera mais ampla de atividade. As informações fornecidas pela genômica, pela proteômica, pela bioinformática e por outras disciplinas, como a bioquímica e a toxicologia, serão integradas para possibilitar a síntese de fármacos novos e mais seguros. À medida que as sequências de todos os nossos genes e suas proteínas codificadas forem determinadas, isso irá revelar numerosos **alvos de ação farmacológica**. Esses estudos também irão revelar **polimorfismos** (termo discutido de modo sucinto no Capítulo 50) de enzimas e proteínas **relacionadas com o metabolismo, a ação e a toxicidade dos fármacos**. Serão desenvolvidos microarranjos capazes de detectá-los, possibilitando a **triagem de indivíduos** à procura de polimorfismos potencialmente deletérios antes de iniciar a terapia farmacológica. Já existem ***chips* de genes** para a análise de alguns genótipos do citocromo P450 (p. ex., para o CYP2D6, cujo produto gênico está envolvido no metabolismo de antidepressivos, antipsicóticos, β-bloqueadores e alguns agentes quimioterápicos). A **Figura 53-2** fornece um resumo de algumas abordagens ao desenvolvimento de novos fármacos. Os principais objetivos no desenvolvimento de novos fármacos consistem em **aprimorar o tratamento** e **proporcionar fármacos mais seguros e personalizados**, levando em consideração os polimorfismos e outros fatores **genéticos** ou **ambientais**. Foi estimado que nos EUA, ocorrem cerca de 100.000 mortes anualmente devido a reações adversas a fármacos. Espera-se que as novas informações fornecidas pelos estudos nessas novas áreas indicadas na Figura 53-2 e em outras áreas se traduzam em tratamentos bem-sucedidos e, por fim, um novo campo de terapia personalizada. Entretanto, para que isso ocorra, mais pesquisas são necessárias.

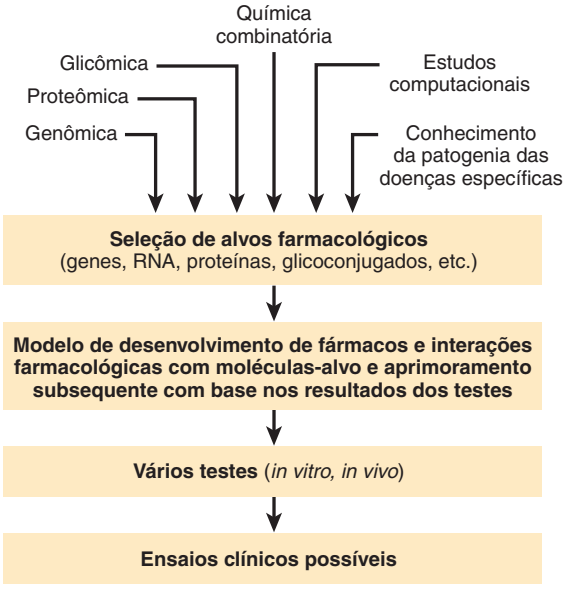


FIGURA 53-2 Esquema simplificado de algumas abordagens para o desenvolvimento de novos fármacos.

RESUMO

- Os xenobióticos são compostos químicos estranhos ao organismo, como fármacos, aditivos alimentares e poluentes ambientais; foram identificados mais de 200.000 xenobióticos.
- Os xenobióticos são metabolizados em duas fases, a principal reação de fase 1 consiste na hidroxilação catalisada por uma variedade de monoxigenases, também conhecidas como citocromos P450. Na fase 2, as espécies hidroxiladas são conjugadas com uma variedade de compostos hidrofílicos, como o ácido glicurônico, o sulfato ou a glutationa. A ação combinada dessas duas fases transforma os compostos hidrofílicos em moléculas hidrossolúveis, que podem ser eliminadas pelo organismo.
- Os citocromos P450 catalisam reações que introduzem um átomo de oxigênio derivado do oxigênio molecular, gerando um produto hidroxilado. O NADPH e a NADPH-citocromo P450 redutase estão envolvidos no mecanismo complexo de reação.
- Todos os citocromos P450 são hemoproteínas que, em geral, exibem ampla especificidade de substrato, atuando em numerosos substratos endógenos e exógenos. Representam os biocatalisadores mais versáteis conhecidos.
- Nos tecidos humanos, são encontrados cerca de 57 genes dos citocromos P450.
- Em geral, os citocromos P450 estão localizados no retículo endoplasmático das células e são particularmente abundantes no fígado.
- Muitos citocromos P450 são induzíveis. Isso possui implicações importantes em determinados fenômenos, como nas interações medicamentosas.
- Existem também citocromos P450 mitocondriais que estão envolvidos na biossíntese do colesterol e dos esteroides.

Eles utilizam uma proteína de enxofre contendo ferro, a adrenodoxina, que não é necessária para as isoformas microssomais.

- Os citocromos P450, em virtude de suas atividades catalíticas, desempenham funções importantes nas reações das células aos compostos químicos, bem como na carcinogênese química.
- As reações da fase 2 são catalisadas por enzimas, como as glicuronosiltransferases, as sulfotransferases e as glutationa--*S*-transferases, que utilizam, respectivamente, o UDP- ácido glicurônico, o PAPS (sulfato ativo) e a glutationa como doadores.
- A glutationa não apenas desempenha um importante papel nas reações da fase 2, como também é um agente redutor intracelular, envolvido no transporte de determinados aminoácidos para dentro das células.
- Os xenobióticos podem produzir uma variedade de efeitos biológicos, incluindo respostas farmacológicas, toxicidade, reações imunológicas e câncer.
- Impulsionado pelos progressos realizados no sequenciamento do genoma humano, o novo campo da farmacogenômica oferece a promessa de desenvolver um grande número de novos fármacos racionalmente planejados e mais seguros.

REFERÊNCIAS

Caskey CT: Using genetic diagnosis to determine individual therapeutic utility. Annu Rev Med 2010;61:1.

Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee. http://www.imm.ki.se/CYPalleles/

Ingelman-Sundberg M: Pharmacogenomic biomarkers for prediction of severe adverse drug reactions. N Engl J Med 2008;358:637.

Kalant H, Grant DM, Mitchell J (editors): *Principles of Medical Pharmacology,* 7th ed. Saunders Elsevier, 2007. (Chapters 4 [Drug Biotransformation by Riddick DS] and 10 [Pharmacogenetics and Pharmacogenomics by Grant DM and Kalow W] are particularly relevant to this Chapter).

Kamali F, Wynne H: Pharamacogenetics of Warfarin. Annu Rev Med 2010;61:63.

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ (editors): *Basic & Clinical Pharmacology,* 11th ed. McGraw-Hill, 2009.

Lee C, Morton CC: Structural genomic variation and personalized medicine. N Engl J Med 2008;358:740.

Pharmacogenomics. Human Genome Project Information. http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/medicine.pharma.shtml

Shurin SB, Nabel EG: Pharmacogenomics—ready for prime time? N Engl J Med 2008:358:1061.

CAPÍTULO

54

A Bioquímica do Envelhecimento

Peter J. Kennelly, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever as características essenciais das teorias de uso e desgaste do envelhecimento.
- Citar pelo menos quatro fatores ambientais comuns que comprovadamente causam lesão de macromoléculas biológicas, como proteínas e DNA.
- Elucidar por que as bases nucleotídicas são particularmente vulneráveis ao dano.
- Delinear a diferença fisiologicamente mais importante entre os genomas mitocondrial e nuclear.
- Detalhar a teoria oxidativa do envelhecimento e citar principais fontes de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos seres humanos.
- Descrever três mecanismos pelos quais as células evitam ou efetuam o reparo dos danos causados por ROS.
- Referir os princípios básicos das teorias metabólicas do envelhecimento.
- Especificar o mecanismo do "relógio de contagem regressiva" do telômero.
- Relatar nossa compreensão atual da contribuição genética para o envelhecimento.
- Explicar as implicações evolutivas de um tempo de vida geneticamente codificado.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Levando em conta os vários estágios no tempo de vida do *Homo sapiens,* a lactância e a infância caracterizam-se por um crescimento contínuo tanto na altura quanto na massa corporal. Ocorre desenvolvimento das habilidades motoras e intelectuais básicas, como a marcha, a linguagem, etc. A lactância e a infância também representam um período de vulnerabilidade durante o qual a criança depende dos adultos para obter água, alimentos, abrigo, proteção e instrução. A adolescência testemunha o estirão final do crescimento que ocorre na estrutura do esqueleto. Mais importante ainda é a ocorrência de uma série de mudanças radicais de desenvolvimento – o acúmulo de massa muscular, a perda da "gordura de bebê", a maturação das gônadas e do tecido cerebral e o aparecimento das características sexuais secundárias —, que transformam a criança dependente em um adulto forte, independente e capaz de se reproduzir. A idade adulta, o período mais longo da vida, não apresenta nenhuma mudança física radical em termos de crescimento ou desenvolvimento. Com a notável exceção da gravidez nas mulheres, não é raro que os adultos mantenham o mesmo peso corporal, aparência e nível geral de atividade durante duas ou três décadas.

Salvo a ocorrência de alguma doença ou lesão fatal, o início da etapa final de vida, a velhice, é sinalizado pelo reaparecimento de mudanças físicas e fisiológicas. Os cabelos começam a ficar perceptivelmente finos e tornam-se brancos ou cinza com a perda de sua pigmentação. A pele perde a sua elasticidade e acumula manchas. O indivíduo parece encolher à medida que ocorre perda progressiva das massas muscular e óssea. O tempo de atenção e a memória declinam. Por fim, inevitavelmente, a própria vida chega ao término quando uma ou mais funções orgânicas essenciais cessam de operar.

A compreensão das causas subjacentes, dos fatores desencadeantes do envelhecimento e das alterações que acompanham esse processo é de grande importância biomédica. As síndromes de Hutchison-Gilford, de Werner e de Down são três doenças genéticas humanas cujas patologias incluem uma aceleração de muitos dos eventos fisiológicos associados ao envelhecimento. Retardar ou interromper alguns dos processos degenerativos que causam o envelhecimento ou que o acompanham nesse último estágio de vida podem conceder ao indivíduo mais vitalidade,

torná-lo mais produtivo e fornecer uma vida plena. O reconhecimento dos fatores responsáveis por desencadear a morte celular poderá permitir aos médicos destruir seletivamente os tecidos e as células prejudiciais, como tumores, pólipos e cistos, sem dano colateral dos tecidos sadios.

TEMPO DE VIDA *VERSUS* LONGEVIDADE

Do Paleolítico até a Idade Média, passando pela idade de ouro da Grécia, a expectativa média de vida para um recém-nascido permaneceu relativamente constante, oscilando entre 25 e 35 anos. A partir do renascimento, esse número aumentou gradualmente, de modo que, ao chegar o século vinte, a expectativa de vida de indivíduos nascidos em países desenvolvidos atingiu, em média, cerca de 40 anos. Atualmente, decorridos 100 anos, a média atual no mundo é de 67 anos e, para os países desenvolvidos, aproxima-se dos 80. Isso levou a imprensa popular a especular por quanto tempo seria possível esperar que essa tendência continue. As futuras gerações poderão esperar viver por mais de 100 anos? É possível que os seres humanos tenham o potencial, com a exceção da ocorrência de acidentes e com os devidos cuidados e manutenção apropriada, de viver indefinidamente?

Infelizmente, é pouco provável que essa extrapolação se concretize, pois ela se baseia em uma interpretação equívoca do termo **expectativa de vida**. A expectativa de vida é calculada a partir da média de todos os nascimentos. Portanto, é acentuadamente influenciada pela taxa de mortalidade infantil. Enquanto a expectativa de vida de uma criança romana era de 25 anos, se for calculado o tempo de vida esperado apenas para os indivíduos que sobreviveram na lactância, um cálculo que se refere à **longevidade**, a média irá quase duplicar para 48. Se for considerado o acentuado declínio na taxa de mortalidade infantil que ocorreu nesses últimos 150 anos, a duplicação aparente no tempo de vida dos seres humanos desaparece em grande parte, *mas não inteiramente.* Conforme observado na **Tabela 54-1**, a longevidade prevista de uma criança de 5 anos de idade nos EUA aumentou de 70,5 anos em 1950 para 77,5 anos em 2000. Existe algum tipo de limite superior para o tempo de vida de um ser humano adequadamente nutrido e bem mantido? Talvez não.

TABELA 54-1 Expectativa de vida média por década nos EUA

Período	Expectativa de vida média (Anos)	
	A partir do nascimento	Com sobrevida até os 5 anos
1900 a 1902	49,24	59,98
1909 a 1911	51,49	61,21
1919 a 1921	56,40	62,99
1929 a 1931	59,20	64,29
1939 a 1941	63,62	67,49
1949 a 1951	68,07	70,54
1959 a 1961	69,89	72,04
1969 a 1971	70,75	72,43
1979 a 1981	73,88	75,00
1989 a 1991	75,37	76,22
1999 a 2001	76,83	77,47

Adaptada da Tabela 12 do *National Vital Statistics Reports* (2008) 57, vol. 1.

ENVELHECIMENTO E MORTALIDADE: PROCESSOS INESPECÍFICOS OU PROGRAMADOS?

Serão o envelhecimento e a morte processos indeterminados ou **estocásticos**, em que as criaturas alcançam inevitavelmente um ponto crítico, onde sucumbem a um acúmulo de danos durante a vida, causados por doenças, lesões e simples uso e desgaste? Embora o corpo humano tenha certa capacidade de reparo e reposição em níveis molecular e celular, essa capacidade é variável e finita. Não importa quanta atenção seja dispensada aos cuidados e à manutenção, como um automóvel ou algum outro aparelho mecânico sofisticado, mais cedo ou mais tarde algum componente essencial de nosso corpo irá se desgastar. Outra escola de pensamento postula que o envelhecimento e a morte são processos geneticamente programados análogos à puberdade, que evoluíram por um processo de seleção natural.

Com toda probabilidade, o envelhecimento e a morte são processos multifatoriais, em que numerosos fatores, alguns indeterminados e outros programados, fazem importantes contribuições. Embora muito estudo e pesquisa ainda sejam necessários para que se possa definir a exata constituição desse mosaico mecanicista, foram identificados numerosos fatores contribuintes potenciais. Dentre esses fatores, os mais proeminentes são considerados nas seções que se seguem.

TEORIAS DE USO E DESGASTE DO ENVELHECIMENTO

Muitas teorias sobre o envelhecimento e a mortalidade sustentam a hipótese de que o corpo humano acaba sucumbindo ao acúmulo de agressões ocorridas com o passar do tempo em consequência de fatores ambientais, os quais reagem com biomoléculas orgânicas. Essas teorias assinalam que, embora existam mecanismos de reparo e de renovação para repor ou substituir muitas classes de moléculas danificadas, estes não são absolutamente perfeitos. Por isso, algumas lesões escapam, as quais irão inevitavelmente se acumular com o passar do tempo, particularmente em populações de células de vida longa que sofrem pouca ou nenhuma renovação (**Tabela 54-2**). Ironicamente, muitos dos agentes que causam maior dano às proteínas, ao DNA e a outras biomoléculas também são essenciais para a vida terrestre: a água, o oxigênio e a luz solar.

As reações hidrolíticas podem causar dano das proteínas e dos nucleotídeos

A água é um nucleófilo relativamente fraco. Entretanto, em virtude de sua presença ubíqua e alta concentração (>55 M, ver Capítulo

TABELA 54-2 Tempo necessário para todas as células médias desse tipo serem renovadas

Tipo de tecido ou célula	Renovação
Epitélio intestinal	34 horas[1]
Epiderme	39 dias[2]
Leucócitos	< 1 ano[3]
Adipócitos	9,8 anos[3]
Musculoesquelético intercostal	15,2 anos[3]
Cardiomiócitos	≥ 100 anos[3]

Dados de:
[1]Potten CS, Kellett M, Rew DA, et al: Proliferation in human gastrointestinal epithelium using bromodeoxyuridine in vivo. Gut 1992;33:524.
[2]Weinstein GD, McCullough JL, Ross P: Cell proliferation in normal epidermis. J Invest Dermatol 1984;82:623.
[3]Spalding KL, Arner E, Westermark PO, et al: Dynamics of fat cell turnover in humans. Nature 2008;453:783

2), até mesmo esse nucleófilo fraco irá reagir com alvos suscetíveis no interior das células. Nas proteínas, a hidrólise das ligações peptídicas leva à clivagem da cadeia polipeptídica. As ligações amida mais frequentemente atacadas pela água são aquelas encontradas nas cadeias laterais dos aminoácidos asparagina e glutamina, presumivelmente por serem mais expostas, em média, ao solvente do que aquelas presentes na estrutura da proteína. A hidrólise resulta na substituição do grupo amida neutro por um grupo ácido de ácido carboxílico, formando aspartato e glutamato, respectivamente (**Figura 54-1, partes A e B**). Essa mudança leva à introdução de uma carga negativa e de um doador ou aceptor de prótons potencial na região afetada da proteína. Como a população de proteínas no organismo vivo está sujeita a renovação contínua, a proteína quimicamente modificada será, na maioria dos casos, degradada e substituída por uma proteína recém-sintetizada.

As reações das bases nucleotídicas do DNA com a água são talvez as de maior consequência biológica potencial. Os grupos amino que se projetam dos anéis aromáticos heterocíclicos das bases nucleotídicas, citosina, adenina e guanina, são suscetíveis ao ataque hidrolítico, com substituição do grupo amino por um grupo carbonila, formando uracila, hipoxantina e xantina, respectivamente (**Figura 54-1, parte C**). Se a base afetada estiver localizada no DNA da célula, o resultado final é uma mutação que, se for mantida sem reparo, poderá perturbar potencialmente a expressão dos genes ou produzir um produto gênico disfuncional. A ligação entre a base nucleotídica e a desoxirribose no DNA também é vulnerável à hidrólise. Nesse caso, a base é totalmente eliminada, deixando uma lacuna na sequência (**Figura 54-1, parte D**) que, se for mantida sem reparo, pode levar a uma substituição ou a uma mutação de fase de leitura (ver Capítulo 37).

Muitas outras ligações dentro das macromoléculas biológicas também têm o potencial de serem clivadas por hidrólise química randômica. Nessa lista estão incluídas as ligações éster que ligam os ácidos graxos a seus glicerolipídeos relacionados, as ligações glicosídicas que ligam as unidades de monossacarídeos dos carboidratos e as ligações fosfodiéster que mantêm unidos

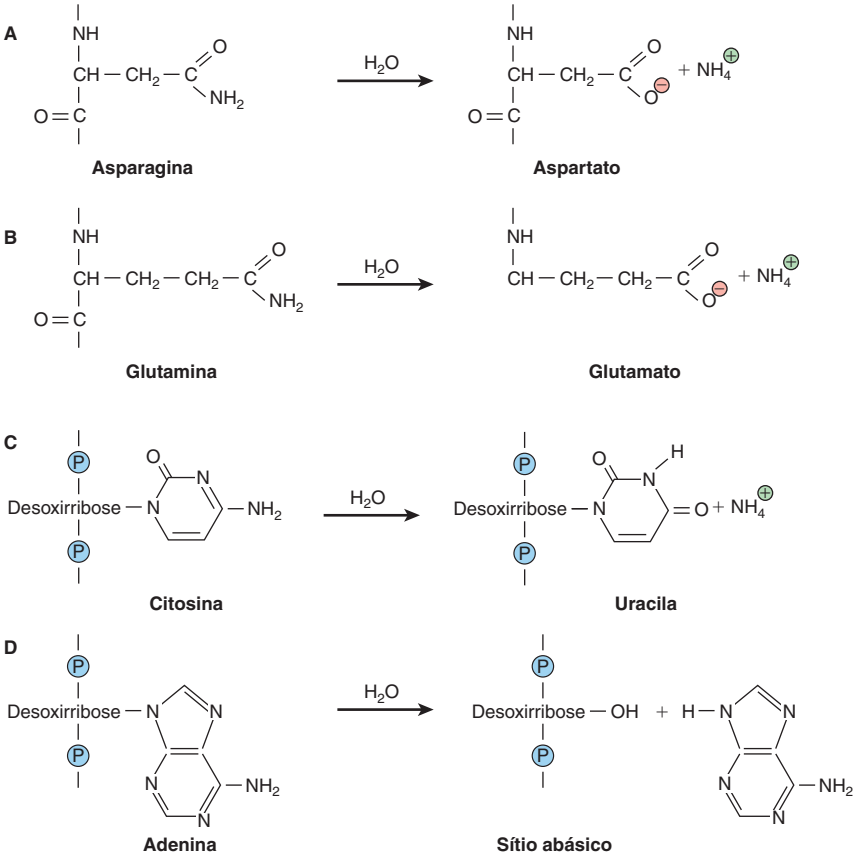


FIGURA 54-1 Exemplos de dano hidrolítico nas macromoléculas biológicas. Estão ilustradas algumas maneiras pelas quais a água pode reagir com as proteínas e o DNA, produzindo alterações químicas: (**A**) Substituição efetiva do ácido aspártico por desamidação hidrolítica da cadeia lateral neutra da asparagina. (**B**) Substituição efetiva do ácido glutâmico por desamidação hidrolítica da cadeia lateral neutra da glutamina. (**C**) Mutação efetiva da citosina em uracila pela água. (**D**) Formação de um sítio abásico no DNA por clivagem hidrolítica de uma ligação ribose-base.

os polinucleotídeos e que ligam os grupos cabeça dos fosfolipídeos com seus diacilgliceróis. Entretanto, essas reações parecem ocorrer muito raramente (hidrólise fosfodiéster) ou gerar produtos insuficientemente prejudiciais para produzir consequências biológicas significativas.

A respiração gera espécies reativas de oxigênio

Numerosos processos biológicos exigem a oxidação catalisada por enzimas de moléculas orgânicas pelo oxigênio molecular (O_2). Esses processos incluem a hidroxilação das cadeias laterais de prolina e lisina no colágeno (Capítulo 5), a destoxificação dos xenobióticos pelo citocromo P450 (Capítulo 53), a degradação dos nucleotídeos purínicos em ácido úrico (Capítulo 33), a reoxidação dos grupos prostéticos nas enzimas contendo flavina que catalisam a descarboxilação oxidativa (p. ex., o complexo de piruvato-desidrogenase, Capítulo 18) e outras reações redox (p. ex., aminoácido oxidases, Capítulo 28), bem como a geração do gradiente quimiosmótico nas mitocôndrias pela cadeia de transporte de elétrons (Capítulo 13). As enzimas redox frequentemente empregam grupos prostéticos, como flavina nucleotídeos, centros ferro-enxofre ou íons metálicos ligados ao heme (Capítulos 12 e 13) para auxiliar na difícil tarefa de gerar e estabilizar os intermediários de oxiânions e radicais livres altamente reativos que são formados durante a catálise. A cadeia de transporte de elétrons emprega carreadores especializados, como a ubiquinona e os citocromos, para o transporte seguro de elétrons isolados não pareados entre e dentro de seus vários complexos multiproteicos.

Em certas ocasiões, esses intermediários altamente reativos escapam na célula sob a forma de ROS, como superóxido e peróxido de hidrogênio (**Figura 54-2, parte A**). Em virtude de sua complexidade estrutural e funcional e do nível extremamente alto de fluxo de elétrons, o "vazamento" da cadeia de transporte de elétrons constitui, de longe, a principal fonte de ROS na maioria das células de mamíferos. Além disso, muitas células de mamíferos sintetizam e liberam o mensageiro secundário óxido nítrico (NO), que contém um elétron não pareado, para promover a vasodilatação e o relaxamento muscular no sistema cardiovascular (Capítulo 49).

As espécies reativas de oxigênio são quimicamente prolíficas

Em virtude de sua reatividade extremamente alta, as espécies reativas de oxigênio (ROS) são muito perigosas. As ROS podem reagir com praticamente qualquer composto orgânico e alterá-lo quimicamente, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. Em alguns casos, a reação leva à clivagem de ligações covalentes. Além disso, apresentam uma forte tendência a formar **adutos**, isto é, produtos da adição direta de dois (ou mais) compostos, com bases nucleotídicas, ácidos graxos poli-insaturados e outros compostos biológicos que apresentam múltiplas ligações duplas (**Figura 54-3**). Os adutos formados com bases nucleotídicas podem ser particularmente perigosos, em virtude de seu potencial, quando não corrigido, de causar leituras errôneas que introduzem mutações no DNA.

A facilidade com que o oxigênio provoca as alterações químicas que tornam a manteiga rançosa é uma prova da reatividade das gorduras insaturadas, as que contêm uma ou mais ligações duplas de carbono-carbono (Capítulo 23) com ROS. A peroxidação dos lipídeos pode levar à formação de adutos de lipídeo-lipídeo e lipídeo-proteína de ligação cruzada, bem como a uma perda da fluidez e integridade da membrana. Por sua vez, a perda de integridade da membrana pode – no caso das mitocôndrias – prejudicar a eficiência com que a cadeia de transporte de elétrons converte equivalentes redutores em ATP, resultando em maior produção de ROS deletérias. A perda de integridade da membrana também pode desencadear o processo de **apoptose**, isto é, a morte programada de uma célula.

As reações em cadeias multiplicam a destrutividade das ROS

A destrutividade inerente na alta reatividade de muitas dessas ROS, particularmente os radicais livres, é exacerbada pela sua capacidade de participar em reações em cadeias, nas quais o produto da reação entre o radical livre e alguma biomolécula é uma biomolécula danificada e outra espécie contendo um elétron não pareado altamente reativo. A cadeia será finalizada quando um radical livre for capaz de adquirir outro elétron isolado para formar um par de elétrons relativamente inócuo sem gerar um novo elétron não pareado como subproduto. Este é o caso observado quando um radical livre entra em contato com outro radical livre. Os dois elétrons "ímpares" combinam-se para formar um par. Como alternativa, as ROS podem ser eliminadas por um dos

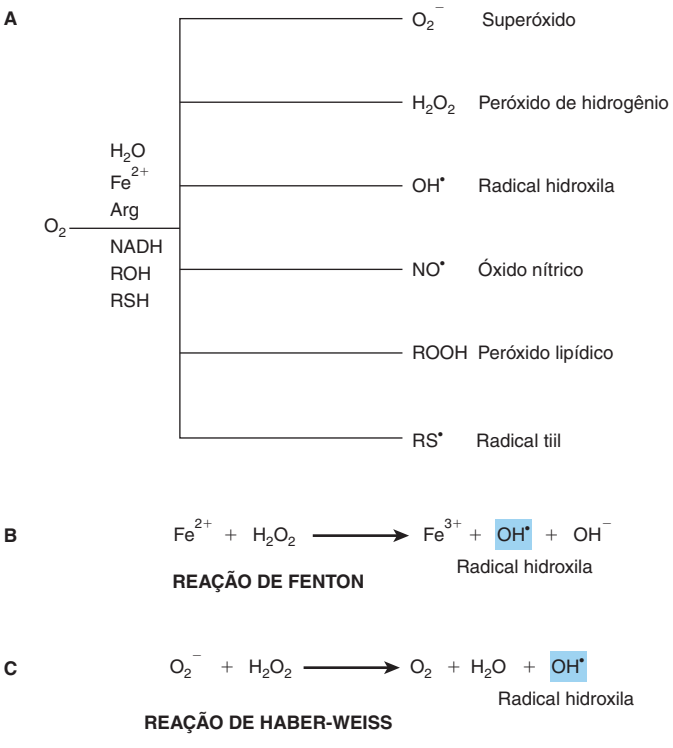


FIGURA 54-2 As espécies reativas de oxigênio (ROS) são subprodutos tóxicos da vida em um ambiente aeróbio. (**A**) São encontrados muitos tipos de ROS nas células vivas. (**B**) Geração de radical hidroxila pela reação de Fenton. (**C**) Geração de radical hidroxila pela reação de Haber-Weiss.

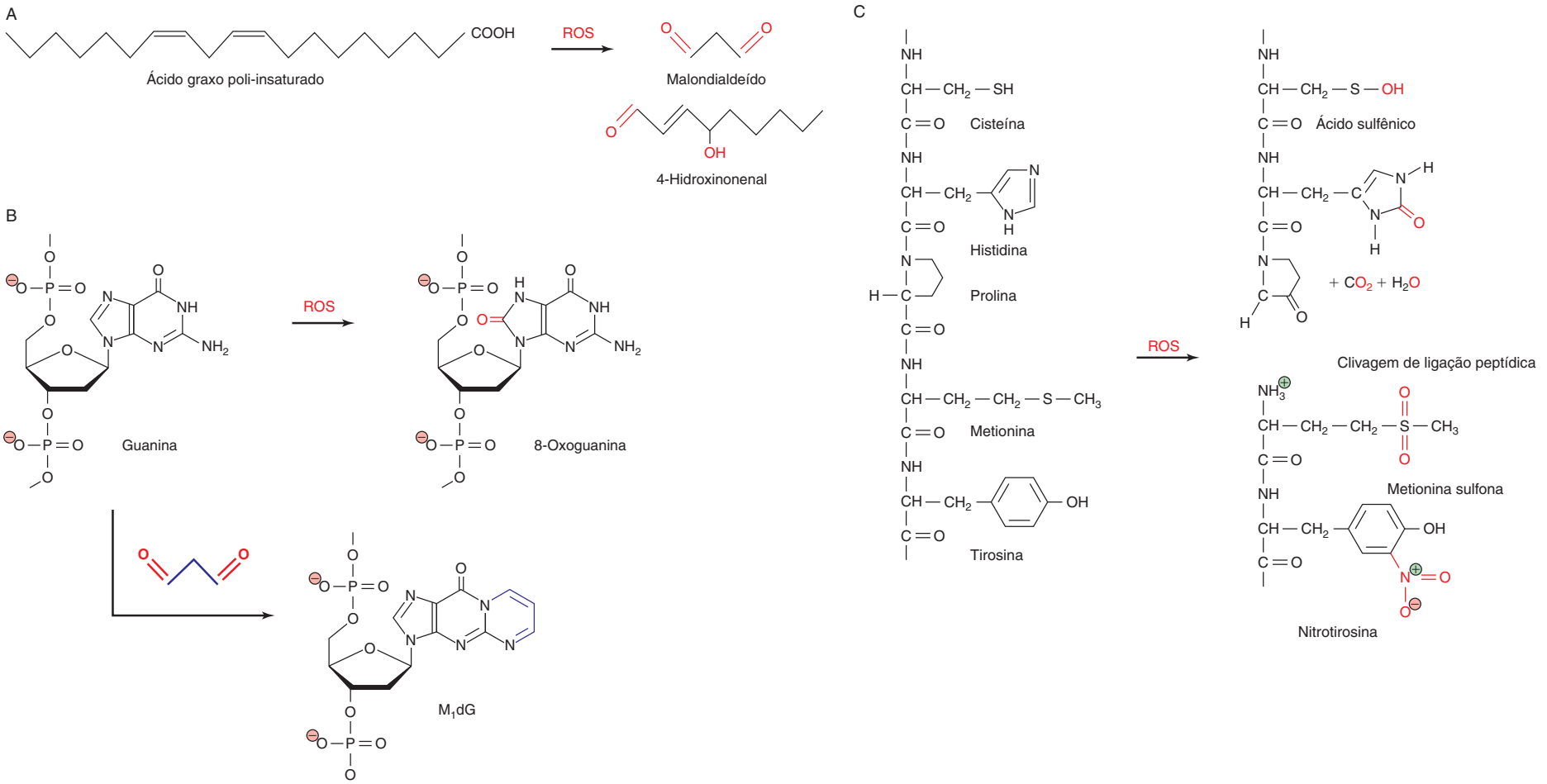


FIGURA 54-3 As ROS reagem direta e indiretamente com uma ampla variedade de moléculas biológicas. (**A**) A peroxidação de lipídeos insaturados gera produtos reativos, como malondialdeído e 4-hidroxinonenal. (**B**) A guanina pode ser diretamente oxidada por ROS, produzindo 8-oxoguanina e formando um aduto, M_1dG, com o produto de ROS, o malondialdeído. (**C**) Reações comuns de proteínas com ROS, incluindo oxidação das cadeias laterais de aminoácidos e clivagem de cadeias peptídicas. Os átomos de oxigênio derivados das ROS estão indicados em vermelho. Os átomos de carbono derivados do malonaldeído no M_1dG estão em azul. O nome químico completo do M_1dG é 3-(2-desoxi-D-*eritro*-pentofuranosil)pirimido(1,2-α)purin-10(3*H*)-ona.

conjuntos de enzimas antioxidantes dedicadas da célula (Capítulos 12 e 52).

A reatividade e, portanto, a destrutividade das ROS variam. Por exemplo, o peróxido de hidrogênio é menos reativo do que o superóxido, que, por sua vez, é menos reativo do que o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$). Infelizmente, existem duas vias nos organismos vivos pelas quais o radical hidroxila altamente tóxico pode ser gerado a partir de ROS menos destrutivas. Por exemplo, na presença de ferro ferroso, a reação de Fenton é capaz de transformar o peróxido de hidrogênio em radicais hidroxila (Figura 54-2, parte B). Por sua vez, o ferro férrico (+3) pode ser novamente reduzido ao estado ferroso (+2) por outras moléculas de peróxido de hidrogênio, permitindo a ação catalítica do ferro para produzir radicais hidroxila adicionais. O radical hidroxila também pode ser produzido quando o superóxido e o peróxido de hidrogênio tornam-se desproporcionais, um processo denominado reação de Haber-Weiss (Figura 54-2, parte C).

Radicais livres e a teoria mitocondrial do envelhecimento

Em 1956, Denham Harmon propôs a denominada teoria dos radicais livres para o envelhecimento. Foi relatado que a toxicidade do tratamento com oxigênio hiperbárico e radiação poderia ser explicada por um fator comum a ambos: a geração de ROS. Esse relato coadunava-se muito bem com a própria observação de Harmon de que o tempo de vida estava inversamente relacionado à taxa metabólica e, por extrapolação, à respiração. Assim, postulou que o dano cumulativo era causado pela produção contínua e inevitável de ROS.

Nos últimos anos, os proponentes da teoria dos radicais livres para o envelhecimento concentraram a sua atenção nas mitocôndrias. Não apenas as mitocôndrias abrigam a principal fonte de ROS na célula, a cadeia de transporte de elétrons, como também o dano oxidativo aos componentes dessa via podem levar a uma liberação aumentada de peróxido de hidrogênio, superóxido, etc. no citoplasma. A lesão das mitocôndrias tenderia a afetar adversamente a eficiência com que elas desempenham a sua função mais importante, isto é, a síntese de ATP. Uma redução significativa na taxa de síntese de ATP poderia facilmente levar aos tipos globais que ocorrem na função fisiológica com o envelhecimento.

Um segundo fator contribuinte para o ciclo autoperpetuante proposto de lesão redox mitocondrial é o fato de que vários componentes da cadeia de transporte de elétrons são codificados pelo próprio genoma da mitocôndria. O genoma mitocondrial é um remanescente vestigial e muito reduzido do genoma da antiga bactéria que foi precursora da atual organela. Por meio de um processo denominado **endossimbiose**, os eucariotos primitivos tornaram-se dependentes de bactérias do meio circundante para lhes fornecer certos materiais, e vice e versa. Finalmente, a bactéria menor foi absorvida e passou a viver no interior de seu hospedeiro eucariótico. Com o passar do tempo, a maior parte dos genes contidos no genoma bacteriano, se não todos, foram eliminados como supérfluos para as necessidades do novo organismo de fusão ou foram transferidos para o DNA nuclear da célula hospedeira. Atualmente, o genoma da mitocôndria humana codifica um RNA ribossomal pequeno e um RNA ribossomal grande, 22 tRNA e subunidades polipeptídicas para os complexos I, III e IV da cadeia de transporte de elétrons, bem como as F_1, F_0 ATPase (**Tabela 54-3**). O genoma mitocondrial carece dos mecanismos de vigilância e de reparo que ajudam a manter a integridade do DNA nuclear. Por isso, as mutações induzidas por adutos ou pela reação com ROS, bem como quaisquer defeitos funcionais decorrentes dessas mutações, passam a constituir uma característica permanente do genoma de cada mitocôndria individual, que irá continuar a acumular mutações com o passar do tempo.

Embora a hipótese mitocondrial não seja mais considerada como capaz de fornecer uma explicação unificadora para todas as alterações que estão associadas ao envelhecimento humano e suas comorbidades, ela provavelmente tem uma importante contribuição. Evidências circunstanciais convincentes para essa hipótese são fornecidas pelo papel central que essa organela desempenha nas vias sensoras de resposta que deflagram o processo de apoptose.

As mitocôndrias são participantes essenciais no processo de apoptose

A apoptose confere aos organismos superiores a capacidade de eliminar seletivamente as células que se tornaram supérfluas por alterações de desenvolvimento, como as que ocorrem de modo contínuo durante a embriogênese ou aquelas que foram danificadas a ponto de não ser possível o seu reparo. Durante a remodelagem do tecido em desenvolvimento, o programa de apoptose celular é desencadeado por sinais mediados por receptores. No caso de células lesionadas, qualquer um de vários indicadores internos pode atuar como deflagrador: ROS, dsRNA viral, lesão do DNA e choque térmico. Esses sinais deflagram a abertura do complexo de poros de transição de permeabilidade inseridos na membrana externa da mitocôndria, pelos quais as moléculas de citocromo c, a pequena proteína carreadora de elétrons (≈12,5 kDa), escapam no citoplasma. No citoplasma, o citocromo c atua como proteína central para a formação de um complexo multiproteico, denominado apoptossomo, que dá início a uma cascata de eventos de ativação proteolíticos direcionados para as formas de proenzima de uma série de cisteína proteases, conhecidas como caspases. As caspases terminais, números 3 e 7, degradam as proteínas estruturais no citoplasma e as proteínas da cromatina no núcleo; esses eventos levam à morte da célula afetada e à sua eliminação por fa-

TABELA 54-3 Genes codificados pelo genoma das mitocôndrias humanas

rRNA	12S, 16S rRNA
tRNA	22 tRNA (2 para a Leu e Ser)
Subunidades de NADH-ubiquinona oxidorredutase (Complexo I, > 40 no total)	ND 1-6, ND 4L
Subunidades de ubiquinol-citocromo c oxidorredutase (Complexo III, 11 no total)	Citocromo b
Subunidades de citocromo-oxidase (Complexo IV, 13 no total)	COX I, COX II, COX III
Subunidades da F_1, F_0 ATPase (ATP sintase, 12 no total)	ATPase 6, ATPase 8

gocitose. Desnecessário dizer que a presença de uma via intrínseca de morte celular mediada por receptor oferece a esperança de que, futuramente, as células prejudiciais possam ser eliminadas, como as do câncer, pelo aprendizado sobre como ativar seletivamente suas vias apoptóticas.

A radiação ultravioleta pode ser extremamente prejudicial

O termo **radiação ultravioleta** (**UV**) refere-se aos comprimentos de onda de luz situados imediatamente além do azul ou à extremidade de comprimentos de onda curtos do espectro visível. Embora o olho humano não possa detectar esses comprimentos de onda de luz, eles são fortemente absorvidos por compostos orgânicos que possuem anéis aromáticos ou múltiplas ligações duplas conjugadas, como as bases nucleotídicas do DNA e RNA; as cadeias laterais aromáticas dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano; ácidos graxos poli-insaturados; grupos heme; e cofatores e coenzimas, como flavinas, cianocobalamina, etc. A absorção dessa luz de comprimentos de onda curtos e de alta energia pode causar a ruptura das ligações covalentes nas proteínas, no DNA e no RNA; a formação de dímeros de timina no DNA (**Figura 54-4**); a ligação cruzada de proteínas; e a geração de radicais livres, incluindo ROS. Apesar de a radiação UV não penetrar além das primeiras camadas de células cutâneas, a alta eficiência de sua absorção leva ao rápido acúmulo de lesão da população limitada de células cutâneas que sofrem impacto. Como as bases nucleotídicas do DNA e do RNA são particularmente efetivas na absorção da radiação UV, ela é altamente mutagênica. A exposição prolongada à luz solar intensa pode levar ao acúmulo de múltiplas lesões do DNA, que podem sobrecarregar a capacidade intrínseca de reparo da célula. Assim, é relativamente comum que as pessoas que trabalham ou cujo estilo de vida envolve uma exposição prolongada à luz solar manifestem alterações do tecido cutâneo na forma de nevos e mielomas cancerosos. Muitos destes últimos podem proliferar e disseminar-se com muita rapidez, exigindo cuidadosa vigilância e intervenção médica rápida.

A glicação das proteínas frequentemente leva à formação de ligações cruzadas prejudiciais

Quando grupos amino, como aqueles encontrados na cadeia lateral da lisina ou em algumas das bases nucleotídicas, são expostos a um açúcar redutor, como a glicose, surge lentamente um aduto reversível por intermédio da formação de uma base de Schiff entre o grupo aldeído ou cetona do açúcar e a amina. Com o passar do tempo, a proteína glicada sofre uma série de rearranjos para formar produtos de **Amadori**, que contêm uma dupla ligação carbono-carbono conjugada, capaz de reagir com o grupo amino de uma proteína adjacente (**Figura 54-5**). O resultado final consiste na formação de uma ligação cruzada covalente entre duas proteínas ou outras macromoléculas biológicas que, por sua vez, podem sofrer glicação adicional e ligação cruzada com outra macromolécula. Esses agregados com ligação cruzada são algumas vezes denominados Produtos Finais da Glicação Avançada ou AGEs.

O impacto fisiológico da glicação das proteínas pode ser particularmente pronunciado quando proteínas de vida longa, como o colágeno ou as β-cristalinas, estão envolvidas. Sua persistência fornece a oportunidade para a ocorrência de múltiplos eventos de glicação e ligação cruzada. A ligação cruzada progressiva da

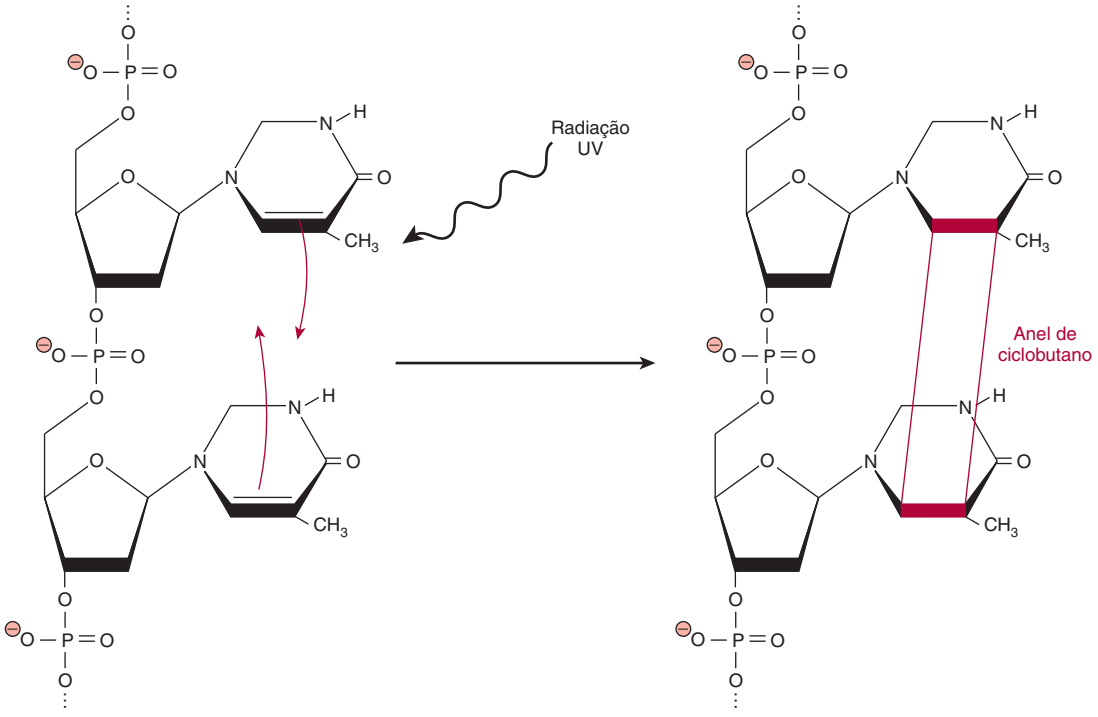


FIGURA 54-4 Formação de um dímero de timina após excitação pela luz UV. Quando bases consecutivas de timina estão empilhadas umas sobre as outras em uma dupla-hélice de DNA, a absorção de luz UV pode levar à formação de um anel de ciclobutano (em vermelho, sem escala) ligando de modo covalente as duas bases para formar um dímero de timina.

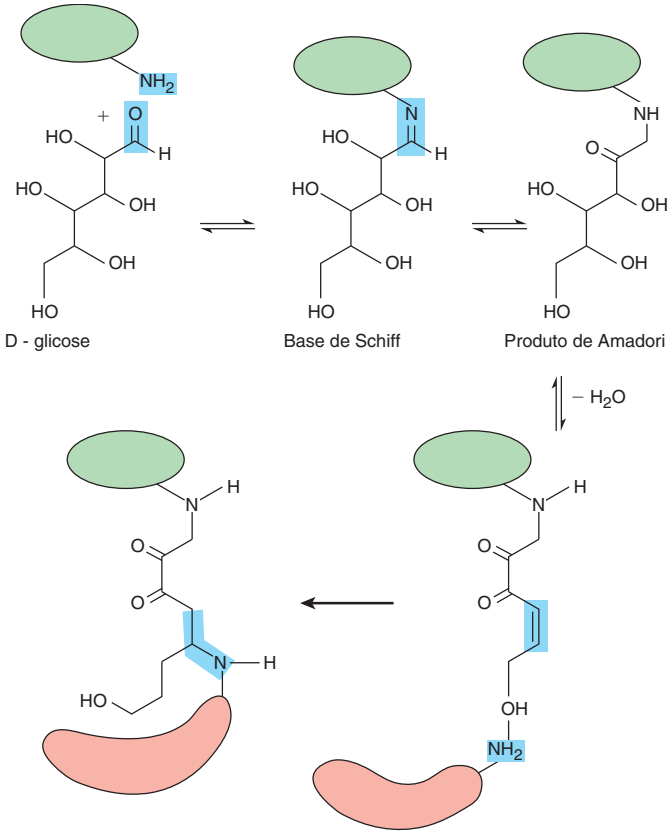


FIGURA 54-5 A glicação das proteínas pode levar à formação de ligações cruzadas de proteína-proteína. A figura mostra a sequência de reações que gera o produto de Amadori na superfície da proteína indicada em verde e a formação subsequente de uma ligação cruzada de proteína-proteína por meio de um grupo amino na superfície de uma segunda proteína em vermelho.

rede de colágeno nas células endoteliais vasculares leva à perda progressiva da elasticidade e ao espessamento da membrana basal dos vasos sanguíneos, promovendo a formação de placas. O resultado global consiste em aumento progressivo da carga de trabalho do coração. Nos olhos, o acúmulo de proteínas agregadas compromete a opacidade da lente e manifesta-se finalmente na forma de catarata. O comprometimento da homeostasia da glicose torna o diabético particularmente suscetível à formação de produtos finais da glicação avançada. Com efeito, a glicação da hemoglobina e da albumina sérica é usada como biomarcador para o diagnóstico de diabetes melito e a avaliação de seu tratamento.

MECANISMOS DE REPARO MOLECULAR PARA COMBATER O USO E DESGASTE

Os mecanismos enzimáticos e químicos interceptam as ROS prejudiciais

Um corolário da teoria de uso e desgaste do envelhecimento é o fato de que a longevidade reflete a eficiência e a robustez dos mecanismos de prevenção, reparo e reposição moleculares em determinada espécie e nos indivíduos a ela pertencentes. Enzimas como a superóxido dismutase e a catalase protegem a célula, convertendo o superóxido e o peróxido de hidrogênio, respectivamente, em produtos menos reativos e, portanto, impedindo o dano molecular potencial antes que este ocorra (Capítulo 52). Por exemplo, as drosófilas que foram geneticamente alteradas para expressar níveis elevados de superóxido dismutase apresentam um aumento significativo do tempo de sobrevida.

No citoplasma, a glutationa, um tripeptídeo contendo cisteína, atua como protetor redox químico ao reagir diretamente com as ROS, gerando compostos menos reativos, como a água. A glutationa oxidada, que consiste em dois tripeptídeos ligados por uma ponte S-S, é então reduzida enzimaticamente para manter o reservatório de proteção (Capítulo 52). A glutationa também pode reagir diretamente com a cisteína de ácidos sulfênicos e dissulfetos nas proteínas para restaurar o seu estado reduzido e formar produtos de adição com xenobióticos tóxicos (Capítulo 53). Outras biomoléculas, como o ácido ascórbico e a vitamina E, também possuem propriedades antioxidantes, explicando o fato de que muitas dietas "populares" incluem alimentos ricos nesses compostos, em um esforço de sustentar a capacidade do organismo de neutralizar as ROS e retardar o envelhecimento.

A integridade do DNA é mantida por mecanismos de revisão e de reparo

Além das medidas profiláticas mencionadas anteriormente, os organismos vivos são dotados de uma capacidade limitada de

substituir ou repor as macromoléculas danificadas. A maior parte dessa capacidade é concentrada na manutenção da integridade do genoma nuclear (mas não mitocondrial), que confere ao DNA a sua função singular de armazenamento de informações, a vulnerabilidade das bases nucleotídicas aromáticas heterocíclicas à agressão química e radiação UV, e o fato de que – diferentemente de quase todas as outras macromoléculas – cada célula contém apenas uma única cópia singular de cada cromossomo. Uma **célula somática** é uma célula que faz parte do corpo de um organismo. A manutenção da integridade do genoma começa na replicação, durante a qual um cuidadoso processo de revisão assegura que o novo genoma formado no processo de divisão das células somáticas reproduza fielmente o modelo que dirigiu a sua síntese. Além disso, os organismos vivos possuem, em sua maioria, um impressionante quadro de enzimas, cuja função é inspecionar e corrigir aberrações que possam ter escapado do processo de revisão ou que foram subsequentemente produzidas pela ação da água (quebras de duplas fitas, perda de uma base nucleotídica e desamidação da citosina), radiação UV (dímeros de timina e quebras de filamentos) ou exposição a modificadores químicos (formação de adutos). Esse sistema em múltiplas camadas é composto de enzimas de reparo de combinação imprópria, enzimas de reparo por excisão de nucleotídeo e enzimas de reparo por excisão de base, bem como do sistema Ku para reparo de quebras de filamentos duplos na estrutura fosfodiéster (Capítulo 35). Como último recurso, as células que apresentam mutações deletérias estão sujeitas à remoção por apoptose.

Todavia, a despeito das inúmeras precauções tomadas para assegurar a fidelidade durante a replicação e proceder ao reparo subsequente dos danos citados anteriormente, algumas mutações escapam inevitavelmente. Com efeito, é necessário haver algum escape no sistema de vigilância e de reparo para gerar a variabilidade genética que impulsiona a evolução. A **teoria da mutação somática do envelhecimento** propõe que ela também atenda a um segundo propósito, como força propulsora do processo de envelhecimento. Em outras palavras, o acúmulo de células mutantes, com o passar do tempo, deve levar inevitavelmente ao comprometimento da função biológica, que se manifesta, pelo menos em parte, na forma das alterações físicas que são associadas ao processo de envelhecimento.

Alguns tipos de dano proteico são passíveis de reparo

Diferentemente do DNA, a capacidade de uma célula de proceder ao reparo de lesões de outras biomoléculas é relativamente limitada. Em grande parte, as células parecem depender de renovação habitual, em que a população global de determinada biomolécula é degradada e substituída por nova síntese em um processo contínuo ou de base constitutiva (Capítulo 9) para remover os lipídeos, os carboidratos e as proteínas aberrantes. Algumas proteínas, particularmente as proteínas fibrosas que contribuem para a integridade estrutural dos tendões, ligamentos, ossos, matriz, etc., sofrem pouca ou nenhuma renovação. Essas proteínas de longa vida tendem a acumular lesões no transcorrer de muitos anos, contribuindo para a perda da elasticidade nos tecidos vasculares e nas articulações, perda da opacidade da lente, etc. Os mecanismos mais proeminentes para o reparo de proteínas danificadas são direcionados para os átomos de enxofre contidos nas cadeias laterais de cisteína e metionina e para os grupos isoaspartil formados pelo deslocamento da ligação peptídica para o grupo carboxila da cadeia lateral.

O grupo sulfidrila da cadeia lateral da cisteína frequentemente desempenha um importante papel catalítico, regulador e estrutural em proteínas que dependem de seu estado de oxidação. Todavia, tanto o grupo sulfidrila quanto o éter enxofre da metionina são extremamente vulneráveis à oxidação (Figura 54-3, parte C). Como no caso de muitas outras biomoléculas oxidadas, o tripeptídeo glutationa pode reagir diretamente com dissulfetos de cisteína, ácidos cisteína sulfênicos e metionina sulfóxido para regenerar a cisteína e a metionina, respectivamente. Além disso, as dissulfeto redutases e as metionina sulfóxido redutases são responsáveis por um mecanismo de redução catalisado enzimaticamente, que utiliza o NADPH como doador de elétrons. Infelizmente, o potencial de redução da glutationa e do NADPH é suficiente apenas para reduzir os estados de menor oxidação desses átomos de enxofre: cisteína dissulfetos ou ácidos sulfênicos e metionina sulfóxido. O ácido cisteína sulfínico, o ácido cisteína sulfônico e a metionina sulfona são refratários à redução em condições fisiológicas.

Os resíduos de ácido aspártico exibem a geometria precisa necessária para possibilitar a reação do grupo carboxila da cadeia lateral com o grupo amino da ligação peptídica formada com o seu grupo carboxila alfa. A diamida cíclica resultante pode então abrir-se novamente para formar a ligação peptídica original ou um resíduo isoaspartil, no qual a carboxila da cadeia lateral constitui, agora, parte da estrutura peptídica da proteína (**Figura 54-6**). A metilação do grupo carboxila alfa proporciona um grupo que promove a nova formação da diamida cíclica, que então pode abrir-se mais uma vez para formar a ligação peptídica normal (Figura 54-6).

As proteínas agregadas são altamente refratárias à degradação ou ao reparo

As modificações na composição ou na conformação de uma proteína que provocam a sua aderência a outras moléculas de proteínas podem levar à formação de agregados tóxicos, denominados **amiloides**. Esses agregados constituem a característica básica de várias doenças neurodegenerativas, incluindo doença de Parkinson, doença de Alzheimer, doença de Huntington, ataxia espinocerebelar e as encefalopatias espongiformes transmissíveis. Os efeitos tóxicos desses agregados insolúveis são exacerbados pela sua persistência, visto que, nesse estado, a maioria é geralmente refratária à ação catalítica das proteases que normalmente são responsáveis pela sua renovação.

O ENVELHECIMENTO COMO PROCESSO PRÉ-PROGRAMADO

Embora o uso e desgaste moleculares sem dúvida alguma contribuam para o processo do envelhecimento, várias observações também sugerem a participação de mecanismos deterministas programados. Por exemplo, em vez de "enferrujar" gradualmente, muitas das manifestações físicas do envelhecimento – manchas de velhice, cabelos grisalhos, tremor das mãos, lapsos de memória – em geral surgem tardiamente na vida adulta

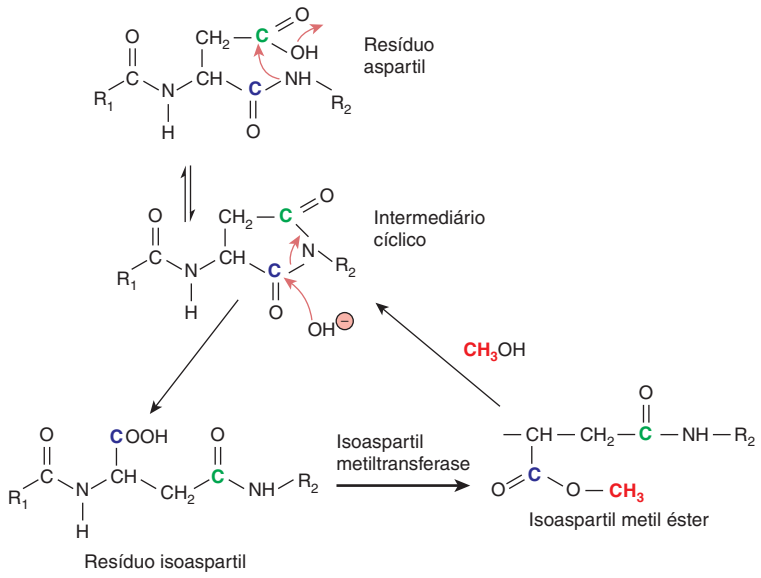


FIGURA 54-6 Formação de uma ligação isoaspartil em uma estrutura polipeptídica e seu reparo pela intervenção da isoaspartil metiltransferase. A figura mostra a sequência de reações químicas e catalisadas por enzimas que levam à formação de uma ligação isoaspartil e restauração de uma ligação peptídica normal. Os carbonos que correspondem ao alfa e ao ácido carboxílico da cadeia lateral no ácido aspártico estão em azul e verde, respectivamente. As setas vermelhas indicam as vias de ataque nucleofílico durante a ciclização e as reações de hidrólise. O grupo metila acrescentado pela isoaspartil metiltransferase está em cor-de-rosa.

e progridem em ritmo acelerado, como se os mecanismos de manutenção moleculares responsáveis pelo seu reparo e substituição tivessem subitamente recebido um comando para cessar a sua operação. A menopausa na mulher fornece um exemplo inequívoco de uma alteração fisiológica associada à idade, que é geneticamente programada e hormonalmente controlada. Os parágrafos que se seguem descrevem várias teorias atuais sobre os mecanismos programados deterministas para o controle do envelhecimento e da morte.

Teorias metabólicas do envelhecimento: "A chama mais brilhante queima mais rápido"

Uma das numerosas variantes da famosa citação atribuída ao antigo filósofo chinês Lao Tzu resume as características proeminentes das **teorias metabólicas do envelhecimento**. Suas origens podem remontar à observação de que as espécies de maior porte no reino animal tendem a viver por mais tempo do que as de menor porte (**Tabela 54-4**). Partindo do raciocínio de que a base causal dessa correlação pode residir em algum fator relacionado ao tamanho, mais do que no próprio tamanho, muitos cientistas concentraram a sua atenção no órgão mais estreitamente associado à vida e vitalidade: o coração. Em geral, a frequência cardíaca em repouso de animais de pequeno porte, como os beija-flores, que é de 250 batimentos por minuto, tende a ser maior que a de animais de grande porte, como as baleias, cuja frequência cardíaca é de 10 a 30 batimentos por minuto. As estimativas do número cumulativo de vezes que o coração de cada animal vertebrado bate ao longo da vida exibiram uma convergência surpreendente de 1,0 x 10^9 batimentos: um bilhão.

A denominada **hipótese dos batimentos cardíacos** postulava que toda criatura viva tem a capacidade de realizar apenas uma determinada quantidade de batimentos cardíacos e/ou respirações. Uma variação mais sutil dessa ideia básica, variadamente designada como **hipótese metabólica** ou **hipótese da taxa de vida**, foi formulada por Raymond Pearl, na década de 1920. Pearl propôs que o tempo de vida de um indivíduo estava reciprocamente ligado à sua taxa metabólica basal. Em outras palavras, aqueles que "viviam em ritmo frenético", por assim dizer, morriam mais cedo. Uma nova série de cálculos revelou que, embora os animais exibam uma acentuada diferença quanto a seu tamanho, longevidade e frequência cardíaca, cada um deles gasta, ao longo da vida, uma quantidade semelhante de energia metabólica total *por unidade de massa corporal*, 7×10^5 J/g. Apesar de ser intuitivamente atraente, a existência de uma ligação mecanística entre o tempo de vida e o tamanho corporal e o gasto de energia ou a taxa metabólica demonstrou ser evasiva. Os defensores da teoria mitocondrial do envelhecimento sugerem que o que está sendo "contado" não são os batimentos cardíacos ou a energia, mas as ROS que constituem o subproduto da respiração. Com o passar do tempo, a produção contínua de energia e o consumo relacionado de O_2 levam ao acúmulo de danos induzidos por ROS no DNA, nas proteínas e nos lipídeos até finalmente alcançar um ponto crítico. A justificativa para as dietas com restrição calórica como meio de prolongar a vida baseia-se no fundamento racional que a queima de menores quantidades de calorias irá resultar em uma redução concomitante na produção de ROS deletérias.

Telômeros: um relógio de contagem regressiva molecular?

Uma segunda linha de pensamento sustenta que o suposto relógio de contagem regressiva que controla o envelhecimento e o tempo de vida não detecta os batimentos cardíacos, a energia ou

TABELA 54-4 Tempo de vida *versus* massa corporal de vários mamíferos

Espécie	Massa aproximada (kg)	Expectativa de vida média na maturidade (anos)
Camundongo de patas brancas	0,02	0,28
Camundongo de cervo (*Peromyscus*)	0,02	0,43
Ratazana (*Myodes*)	0,025	0,48
Esquilo oriental	0,1	1,63
Lagomorfo americano	0,13	2,33
Esquilo terrestre de manto dourado	0,155	2,12
Esquilo vermelho	0,189	2,45
Esquilo terrestre de Belding	0,25	1,78
Esquilo terrestre de Uinta	0,35	1,72
Esquilo cinza oriental	0,6	2,17
Esquilo terrestre do Ártico	0,7	1,71
Coelho norte-americano	1,25	1,48
Doninha	2,25	1,90
Texugo americano	7,15	2,33
Lontra norte-americana	7,2	3,79
Lince vermelho	7,5	2,48
Castor norte-americano	18	1,52
Impala	44	4,80
Carneiro selvagem	55	5,48
Javali selvagem	85	1,91
Javali africano	87	2,82
Tar de Nilgiri	100	4,71
Gnu	165	4,79
Veado vermelho	175	4,90
Antílope (da África do Sul)	200	5,87
Zebra de Burchell	270	7,95
Búfalo africano	490	4,82
Hipopótamo	2.390	16,40
Elefante africano	4.000	19,10

Adaptada de Millar JS, Zammuto: Life histories of mammals. An analysis of life tables. Ecology 1983;64:631.

as ROS. Em vez disso, utiliza os **telômeros** para rastrear o número de vezes que cada célula somática se divide.

Os telômeros são compostos por longas cadeias de repetições de hexanucleotídeos ricas em GT que recobrem as extremidades dos cromossomos eucarióticos. Diferentemente do DNA circular fechado dos genomas bacterianos, o DNA genômico dos eucariotas é linear. Se não estivessem protegidas, as extremidades expostas desses polinucleotídeos lineares estariam acessíveis para participar de eventos de recombinação genética potencialmente carcinogênicos. Uma segunda função dos telômeros consiste em proporcionar algum DNA disponível para acomodar o desperdício que ocorre quando as moléculas de DNA linear sofrem replicação.

Esse desperdício é uma consequência do fato de que todas as DNA-polimerases atuam de modo unidirecional, de 3′ para 5′ (Capítulo 35). Embora isso não represente um problema no DNA circular fechado, quando ocorre replicação das extremidades 5′ de um DNA de fita dupla linear por meio de síntese contínua de 3′ para 5′ e ligação de pequenos fragmentos de **Okazaki**, não há simplesmente espaço suficiente na extremidades para acomodar o pequeno RNA *primer*, a polimerase, etc. A síntese da extremidade 5′ de cada fita será geralmente 100 pb ou mais curta. Toda vez que uma célula se divide, o seu genoma sofre encurtamento adicional (**Figura 54-7**). Os telômeros proporcionam uma fonte inócua de DNA, em que a diminuição de comprimento tem pouca consequência para a célula. Entretanto, uma vez esgotado o suprimento de DNA do telômero, o que corresponde aproximadamente a 100 divisões celulares nos seres humanos, a mitose cessa, e a célula somática entra em um estado de **senescência replicativa**. À medida que mais e mais células no corpo entram nesse estado de senescência, ele gradualmente perde a capacidade de repor as células perdidas ou danificadas.

Os organismos têm a capacidade de produzir uma progênie contendo telômeros de comprimento integral, em virtude da intervenção de uma enzima denominada **telomerase**. A telomerase é uma ribonucleoproteína expressa nas células-tronco e na maioria das células cancerosas, mas não nas células somáticas. Com o uso de um molde de RNA, a telomerase acrescenta sequências repetidas de hexanucleotídeos ricos em GT, que variam desde algumas centenas (leveduras) a vários milhares de nucleotídeos (seres humanos) nas extremidades das moléculas de DNA lineares, a fim de restaurar o comprimento total de seus telômeros. Quando células somáticas são obtidas por engenharia genética no laboratório para expressar a telomerase, elas continuam se dividindo em cultura por muito tempo após cessar a divisão de uma linhagem celular de controle inalterada. A capacidade de impedir a senescência replicativa utilizando uma enzima que mantém o comprimento total dos telômeros representa a evidência mais convincente da atuação de um relógio de telômero.

Kenyon utilizou um organismo-modelo para descobrir os primeiros genes do envelhecimento

Muitos avanços na ciência biomédica representam o produto de pesquisas que utilizam uma variedade de denominados organismos-modelos como seus sujeitos de teste. A mosca-da-fruta, *Drosophila melanogaster,* tem proporcionado uma rica

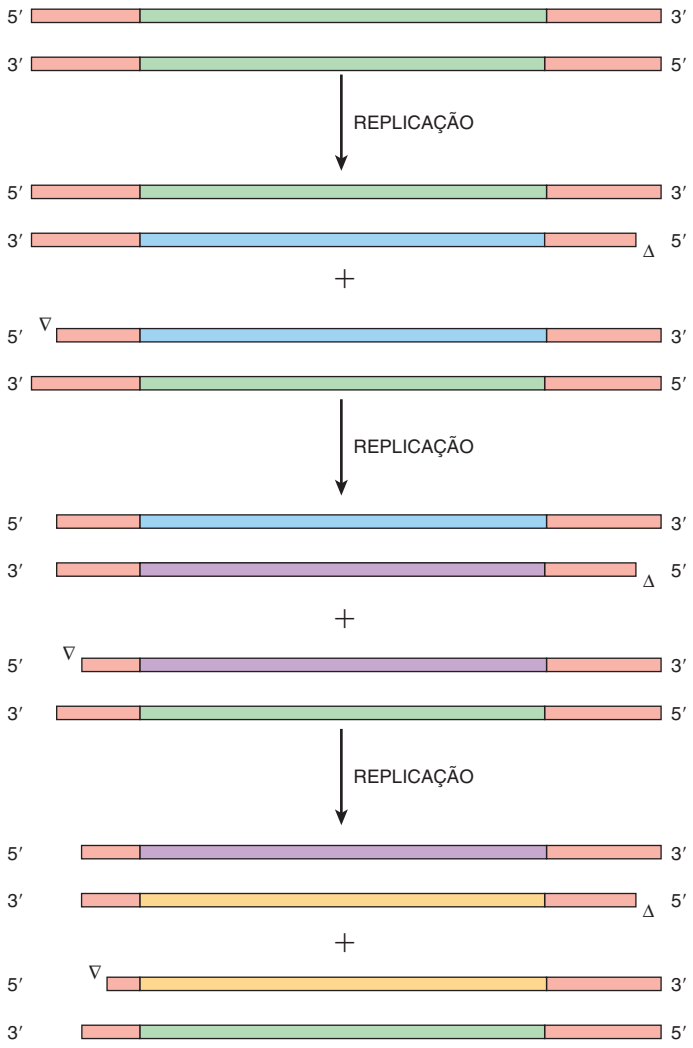


FIGURA 54-7 Os telômeros nas extremidades dos cromossomos eucarióticos tornam-se progressivamente mais curtos a cada ciclo de replicação. Diagrama esquemático do DNA linear de um cromossomo eucariótico (verde) contendo telômeros em cada extremidade (vermelho). Durante a primeira replicação, são sintetizadas novas fitas de DNA (verde) utilizando o cromossomo original como molde. Para maior simplicidade, os dois ciclos seguintes de replicação (violeta, amarelo) mostram apenas o destino do mais baixo dos dois produtos nucleotídicos do ciclo precedente de replicação. As cabeças de seta vazias indicam o local de síntese incompleta da fita. O modelo pressupõe que as projeções de fita simples nas extremidades de cada cromossomo são reduzidas ao completar cada ciclo de divisão celular. Observe o encurtamento progressivo das repetições dos telômeros.

coleta de informações a respeito dos genes que orientam a diferenciação celular e o desenvolvimento dos órgãos. A levedura de pão e a rã-de-unhas africana, *Xenopus laevis,* têm servido de instrumentos para dissecar o complexo circuito de transdução de sinais que coordena o ciclo de divisão celular. Várias linhagens de células de mamíferos em cultura servem de substitutos para adipócitos, células renais, tumores, dendritos, etc. Embora à primeira vista possa parecer que muitos desses sistemas modelos compartilham poucos aspectos em comum com os seres humanos, cada um apresenta atributos exclusivos, tornando-os convenientes como veículos para abordar certos problemas e explorar sistemas específicos.

O *Caenorhabditis elegans* é um verme que serviu como importante material para o estudo da biologia do desenvolvimento. *C. elegans* é transparente e cresce rapidamente, e esses atributos facilitaram o rastreamento de todo o programa de desenvolvimento de todas as 959 células encontradas no adulto maduro até o ovo fertilizado. No início da década de 1990, Cynthia Kenyon e colaboradores observaram que vermes que apresentam mutações no gene que codifica uma molécula semelhante ao receptor de insulina, *daf-2,* tinham um tempo de vida 70% maior do que os vermes de tipo selvagem. Fato igualmente importante foi a observação de que os vermes mutantes comportam-se de modo semelhante ao *C. elegans* de tipo selvagem jovem durante grande parte desse período. Isso constitui uma importante distinção. Para qualificá-lo como "gene de envelhecimento", sua manipulação precisa ter um efeito maior do que meramente prolongar a idade ao retardar o ponto em que a vida cessa. Ele precisa ter impacto na programação das alterações associadas ao envelhecimento.

Uma pesquisa mais pormenorizada dos genes do envelhecimento indica que eles codificam um pequeno conjunto de fatores de transcrição, que incluem PHA-4 ou DAF-16, que presumivel-

mente controlam a expressão de genes críticos de envelhecimento, ou proteínas de sinalização, como DAF-2, que provavelmente ativam PHA-4, DAF-16, etc., em resposta a sinais ambientais específicos. Ainda resta muito a aprender acerca do grau de controle do envelhecimento por eventos de programação genética, e de como esses produtos gênicos interagem com numerosos outros fatores que influenciam a vitalidade e a longevidade, incluindo nutrição, estresse ambiental, etc.

POR QUE A EVOLUÇÃO SELECIONARIA SERES COM VIDA ÚTIL LIMITADA?

A ideia de que os animais teriam desenvolvido mecanismos destinados especificamente a limitar o seu tempo de vida parece, à primeira vista, altamente contraintuitiva. Se a força motriz por trás da evolução é a seleção de traços que potencializam a aptidão e a sobrevida, isso não se traduziria em uma expectativa de vida mais longa? Embora prolongar ao máximo o tempo de vida possa representar um traço desejável do ponto de vista do indivíduo, isso não se aplica necessariamente a uma população ou a uma espécie como um todo. Um limite do tempo de vida geneticamente programado poderia beneficiar o grupo ao eliminar a perda de recursos disponíveis causada por membros que não estão mais ativamente envolvidos na produção, no desenvolvimento e na formação dos descendentes. Com efeito, o atual tempo de vida de três gerações pode ser racionalizado como um tempo proporcionado (a) para que os recém-nascidos cresçam e se tornem adultos jovens reprodutivamente ativos, (b) para que esses adultos jovens possam proteger e nutrir seus filhos e (c) para servir como fonte de orientação e assistência aos adultos jovens que enfrentam os desafios do nascimento e da criação dos filhos.

RESUMO

- O envelhecimento e a longevidade são controlados pela interrelação complexa e, em grande parte, oculta entre fatores aleatórios e deterministas, que incluem programação genética, estresse ambiental, estilo de vida, relógio de contagem regressiva celular e processos de reparo molecular.
- As teorias de uso e desgaste do envelhecimento partem da hipótese de que as alterações associadas ao envelhecimento e à própria morte refletem o acúmulo de danos com o passar do tempo.
- Os elementos ambientais ubíquos e essenciais à vida – água, oxigênio e luz – têm a capacidade intrínseca de provocar lesão de macromoléculas biológicas.
- As ROS, como o radical hidroxila e o superóxido, são particularmente problemáticas, pois são altamente reativas, participam frequentemente de reações em cadeia que multiplicam o seu impacto e são continuamente geradas como subproduto da complexa rede de reações redox que ocorrem na cadeia de transporte de elétrons.
- Em virtude da reatividade de seus sistemas de anéis insaturados e da capacidade de absorver a luz UV, as bases de nucleotídeos do DNA são particularmente vulneráveis à lesão UV ou química.
- As mutações que resultam de erros causados por bases nucleotídicas ausentes ou quimicamente modificadas podem ser particularmente deletérias, já que podem resultar em transformação oncogênica ou tornar uma célula vulnerável a danos subsequentes.
- As mitocôndrias ocupam um lugar central em muitas teorias do envelhecimento e da morte. Essa proeminência pode ser atribuída a diversos fatores. Elas constituem o local da cadeia de transporte de elétrons, que representa, de longe, a maior fonte de ROS na célula.
- A produção eficiente de ATP é essencial para a vitalidade da célula. As mitocôndrias desempenham um papel central na apoptose, isto é, a morte celular programada. As mitocôndrias carecem da capacidade de reparo de lesão de seu DNA.
- Nas células eucarióticas, as extremidades dos cromossomos lineares são recobertas por longas sequências repetidas, denominadas telômeros. Estes sofrem encurtamento progressivo toda vez que uma célula somática se divide. Quando os telômeros de uma célula somática tornam-se demasiado curtos, a célula entra em um estado de senescência replicativa. Em consequência, foi aventada a hipótese de que os telômeros atuam como relógio de contagem regressiva para as células somáticas.
- O tempo de vida dos animais pode ser geneticamente programado. A mutação do gene *daf-2* em *Caenorhabditis elegans* produziu vermes cujo tempo de vida foi 70% maior que o tempo de vida dos vermes de tipo selvagem.
- A seleção evolutiva de um tempo de vida limitado otimiza a vitalidade da espécie, e não a de seus membros individuais.

REFERÊNCIAS

Aguzzi A, O'Connor T: Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives. Nat Drug Discov 2010;9:237.

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 1981; 290:457.

Arias E, Curtin LR, Wei R, et al: U.S. decennial life tables for 1999–2001, United States life tables. Natl Vital Stat Rep 2008;57:1.

Berlett BS, Stadtman ER: Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem 1997;272:20313.

Clarke S: Aging as war between chemical and biochemical processes: Protein methylation and the recognition of age-damaged proteins for repair. Ageing Res Rev 2003;2:263.

Eisenberg DTA: An evolutionary overview of human telomere biology: the thrifty telomere hypothesis and notes on potential adaptive paternal effects. Am J Hum Biol 2011;23:149.

Kenyon CJ: The genetics of aging. Nature 2010;464:504.

Knight JA: The biochemistry of aging. Adv Clin Chem 2000;35:1.

Speakman JR: Body size, energy metabolism and lifespan. J Exp Biol 2005;208:1717.

Ulrich P, Cerami A: Protein glycation, diabetes, and aging. Recent Prog Horm Res 2001;56:1.

CAPÍTULO 55

Câncer: Considerações Gerais

Robert K. Murray, M.D., Ph.D., Molly Jacob, M.B. B.S., M.D., Ph.D., e Joe Varghese, M.B. B.S., M.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Fornecer uma visão geral das características bioquímicas e genéticas importantes das células neoplásicas.
- Descrever as propriedades importantes dos oncogenes e dos genes supressores de tumor.
- Relatar de modo sucinto os conceitos de instabilidade genômica, aneuploidia e angiogênese nos tumores.
- Discutir o uso de marcadores tumorais para acompanhar a resposta ao tratamento e detectar a ocorrência de recidiva.
- Reconhecer que a compreensão recente da biologia do câncer levou ao desenvolvimento de vários novos tratamentos.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Nos EUA e em muitos outros países, o câncer constitui a **segunda causa mais comum de morte** depois da doença cardiovascular. A cada ano, cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo inteiro morrem de câncer, e estima-se que esse número irá aumentar. Seres humanos de todas as idades desenvolvem câncer, e uma grande variedade de órgãos é acometida. No mundo inteiro, os principais tipos de câncer que levam à morte são os que acometem os pulmões, o estômago, o colo, o reto, o fígado e as mamas. Outros tipos de câncer que também resultam em morte incluem os cânceres cervical, de esôfago e de próstata. O câncer de pele é muito comum; entretanto, com a exceção dos melanomas, esses tipos de câncer geralmente não são tão agressivos quanto aqueles mencionados anteriormente. A incidência de muitos tipos de câncer aumenta com a **idade**. Portanto, à medida que as pessoas estão vivendo por mais tempo, um número muito maior irá desenvolver a doença. Os fatores hereditários desempenham um papel em alguns tipos de tumores. Além do enorme sofrimento do indivíduo causado pela doença, o ônus econômico para a sociedade é imenso.

ALGUNS COMENTÁRIOS GERAIS SOBRE AS NEOPLASIAS

Uma neoplasia refere-se a qualquer novo crescimento anormal de tecido. Pode ser de natureza benigna ou maligna. O termo "câncer" está muitas vezes associado a tumores malignos. Os tumores podem surgir em qualquer órgão do corpo e podem resultar em manifestações clínicas distintas, dependendo da localização de seu crescimento.

As células neoplásicas caracterizam-se por determinadas propriedades fundamentais: (1) elas proliferam rapidamente e exibem menor controle sobre o crescimento, (2) apresentam perda da inibição por contato *in vitro* e (3) **invadem** os tecidos locais e **disseminam-se** (metastatizam) para outras partes do corpo. Essas propriedades são características das células dos tumores malignos. Esta última propriedade é a que geralmente é responsável pela morte do paciente com câncer. As células dos tumores benignos também apresentam uma redução do controle de crescimento, porém elas não invadem os tecidos locais nem se disseminam para outras partes do corpo. Outras propriedades importantes das células neoplásicas são as seguintes: (1) elas são **autossuficientes nos sinais de crescimento**, (2) **são insensíveis a sinais de anticrescimento**, (3) estimulam a **angiogênese local** e (4) com frequência, são capazes de **escapar da apoptose**. Esses aspectos estão resumidos na **Figura 55-1**.

A **Figura 55-2** mostra várias outras propriedades importantes associadas às células neoplásicas. Esses vários aspectos são discutidos adiante.

As **questões centrais** relacionadas com o câncer consistem em elucidar os mecanismos bioquímicos e genéticos subjacentes ao crescimento descontrolado das células neoplásicas, sua capacidade de invadir e metastatizar, e em desenvolver tratamentos

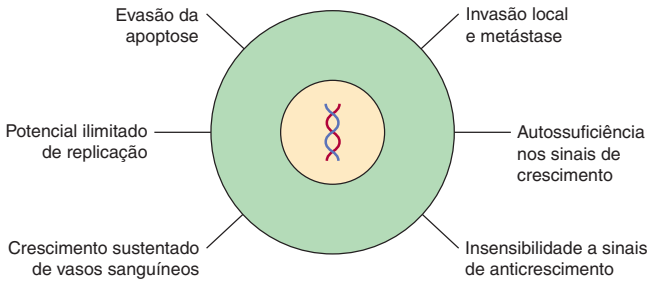


FIGURA 55-1 As seis principais características das células neoplásicas. Outras propriedades importantes das células neoplásicas são mostradas na Figura 55-2. (Com autorização de After Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. Cell 2000; 100:57.)

bem-sucedidos capazes de destruir as células neoplásicas, porém com lesão mínima das células normais. Foram feitos avanços consideráveis na compreensão da natureza básica das células neoplásicas, e uma descoberta fundamental foi a de que o câncer é uma doença causada por anormalidades de genes essenciais. Entretanto, muitos aspectos do comportamento das células neoplásicas, em particular sua capacidade de disseminação, ainda não estão totalmente explicados. Além disso, apesar dos progressos no tratamento de certos tipos de câncer, as terapias ainda não são, com frequência, bem-sucedidas. O estudo do câncer (a oncologia) é uma enorme área, de modo que este capítulo sucinto pretenda apenas apresentar ao leitor alguns conceitos-chave.

No final deste capítulo, o leitor irá encontrar um **Glossário** resumindo os significados de muitos termos utilizados.

CARACTERÍSTICAS FUNDAMENTAIS DA CARCINOGÊNESE

A ocorrência de lesão genética não letal constitui o evento iniciador na carcinogênese. Existem quatro classes principais de genes que, quando afetados por esse tipo de lesão, podem resultar no desenvolvimento de um tumor. São eles: **os proto-oncogenes**, **os genes supressores de tumor, os genes envolvidos no reparo do DNA** e **os que são envolvidos na apoptose**. O câncer é de **origem clonal**, e a multiplicação de uma única célula anormal produz uma massa de células, formando um tumor. Dessa forma, a carcinogênese é um **processo em múltiplas etapas**, com ocorrência de numerosas alterações genéticas nas células, transformando-as de células normais em malignas. Por isso, um tumor frequentemente leva vários anos para se desenvolver.

CAUSAS DA LESÃO GENÉTICA

A lesão genética pode ser causada por mutações adquiridas ou herdadas. As primeiras ocorrem em consequência da exposição a carcinógenos ambientais, enquanto as últimas são hereditárias. Tais anormalidades hereditárias resultam em diversas **condições**

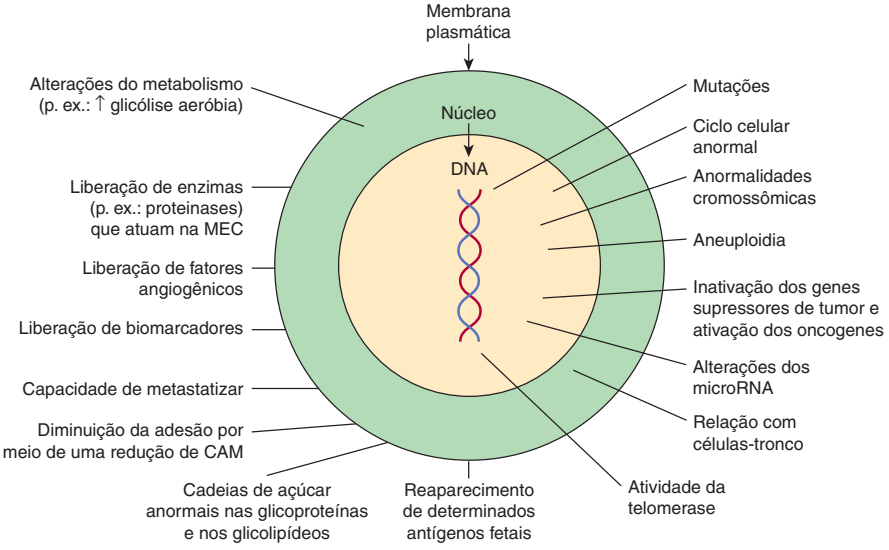


FIGURA 55-2 Algumas alterações bioquímicas e genéticas que ocorrem nas células neoplásicas em seres humanos. Muitas alterações, além daquelas indicadas na Figura 55-1, são observadas nas células neoplásicas, porém apenas algumas delas são mostradas aqui. O papel das mutações na ativação dos oncogenes e na inativação dos genes supressores de tumor é discutido no texto. É comum a ocorrência de anormalidades no ciclo celular e na estrutura dos cromossomos, incluindo aneuploidia. Foram relatadas alterações das moléculas de microRNA que regulam as atividades dos genes, e a relação das células-tronco com as células neoplásicas constitui uma área muito ativa de pesquisa. A atividade da telomerase com frequência pode ser detectada nas células neoplásicas. Algumas vezes, os tumores sintetizam determinados antígenos fetais que podem ser determinados no sangue. Em muitos estudos, foram detectadas alterações nos constituintes da membrana plasmática (p. ex., alteração das cadeias de açúcar de várias glicoproteínas – das quais algumas consistem em moléculas de adesão celular – e glicolipídeos), e essas alterações podem ser importantes no que se refere à diminuição da adesão celular e ocorrência de metástases. Várias moléculas podem ser transportadas para fora das células neoplásicas e ser detectadas no sangue como biomarcadores tumorais. Alguns tumores também liberam fatores angiogênicos e várias proteinases. Foram observadas muitas alterações do metabolismo; por exemplo, as células neoplásicas frequentemente apresentam uma elevada taxa de glicólise aeróbica. (CAM, molécula de adesão celular; MEC, matriz extracelular.)

familiares que predispõem ao desenvolvimento de câncer hereditário. Essas mutações são encontradas em genes específicos (p. ex.: genes supressores de tumor) presentes nas células germinativas, os quais serão discutidos posteriormente.

As **mutações espontâneas**, algumas das quais podem predispor ao câncer, ocorrem com uma frequência de aproximadamente 10^{-7} a 10^{-6} por célula por geração. Essa taxa aumenta nos tecidos sujeitos a uma alta taxa de proliferação, ampliando a geração de células neoplásicas a partir das células originais afetadas. O **estresse oxidativo** (ver Capítulo 45), ao produzir uma quantidade aumentada de espécies reativas de oxigênio, pode constituir um fator no crescimento da taxa de mutações.

A ENERGIA RADIANTE, OS PRODUTOS QUÍMICOS E ALGUNS VÍRUS CONSTITUEM AS PRINCIPAIS CAUSAS CONHECIDAS DE CÂNCER

Em geral, existem três classes de carcinógenos cuja exposição leva à formação de tumores. São a **energia radiante**, **os produtos químicos** e **determinados vírus oncogênicos** (ver **Figura 55-3**). As duas primeiras classes causam mutações no DNA, enquanto a terceira classe geralmente atua por meio da introdução de novos genes em células normais.

De modo sucinto, será descrito o modo pelo qual a energia radiante, os produtos químicos e os vírus oncogênicos causam câncer.

A energia radiante pode ser carcinogênica

Os **raios ultravioleta**, os **raios X** e os **raios-γ** são mutagênicos e carcinogênicos. Estudos aprofundados mostraram que esses agentes podem danificar o DNA de diversas maneiras, incluindo as lesões listadas na **Tabela 55-1**. Acredita-se que as mutações no DNA, devido a esse tipo de lesão, constituam o mecanismo básico da carcinogenicidade causada pela energia radiante, embora as vias exatas ainda estejam em fase de investigação. Os raios X e os raios-γ podem causar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais também podem ser mutagênicas e que provavelmente contribuem para os efeitos carcinogênicos da energia radiante.

A exposição à radiação ultravioleta é comum devido à exposição à luz solar, que constitui a sua principal fonte. Existem numerosas evidências mostrando que essa radiação está ligada ao câncer de pele. O risco de desenvolver um câncer de pele devido à radiação ultravioleta aumenta com a frequência e a intensidade crescentes de exposição e a diminuição do conteúdo de melanina da pele.

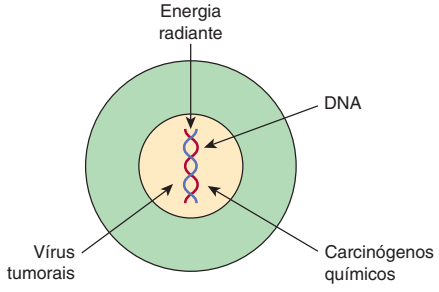


FIGURA 55-3 A energia radiante, os carcinógenos químicos e determinados vírus podem causar câncer.

TABELA 55-1 Alguns tipos de lesão do DNA causados pela energia radiante

• Formação de dímeros de pirimidina.
• Formação de sítios desprovidos de purinas ou de pirimidinas por eliminação das bases correspondentes.
• Formação de quebras de fita simples ou de dupla-fita ou ligação cruzada de fitas de DNA.

A lesão do DNA produzida por agentes ambientais é geralmente removida por mecanismos de reparo do DNA. Os indivíduos que têm uma incapacidade herdada de efetuar o reparo do DNA, conforme observado na xerodermia pigmentosa (ver Capítulo 57) e na ataxia telangiectasia, correm risco aumentado de desenvolver uma neoplasia maligna.

Muitos produtos químicos são carcinogênicos

Uma grande variedade de compostos químicos é carcinogênica (ver **Tabela 55-2** e **Figura 55-4**). Estima-se que talvez **80%** dos cânceres humanos sejam causados por fatores ambientais, principalmente produtos químicos.

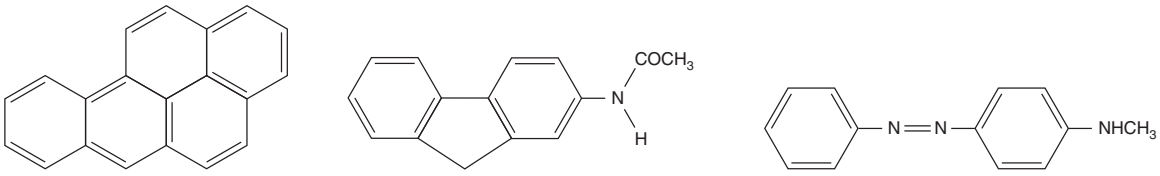
Foram realizados amplos estudos no campo da carcinogênese química. Em geral, acredita-se que os carcinógenos químicos estabelecem, em sua maioria, uma **interação covalente com o DNA**, formando uma ampla variedade de **adutos**. Dependendo do grau de dano ao DNA e de seu reparo por sistemas de reparo do DNA (ver Capítulo 35), pode ocorrer uma variedade de mutações do DNA em consequência da exposição de um animal ou um ser humano a carcinógenos químicos, alguns dos quais contribuem para o desenvolvimento de câncer.

Alguns compostos químicos **interagem diretamente** com o DNA (p. ex.: mecloretamina e β-propiolactona), enquanto outros (**pró-carcinógenos**) exigem a sua conversão por ação enzimática para se transformar em **carcinógenos finais** (**Figura 55-5**). Os carcinógenos finais são, em sua maioria, **eletrófilos** (ou seja, moléculas deficientes em elétrons) e atacam prontamente os grupos nucleofílicos (ricos em elétrons) do DNA. A conversão de compostos químicos em **carcinógenos finais** resulta, principalmente,

TABELA 55-2 Alguns carcinógenos químicos

Classe	Composto
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	Benzo[a]pireno, dimetilbenzantraceno
Aminas aromáticas	2-Acetilaminofluoreno, *N*-metil-4-aminoazobenzeno (MAB)
Nitrosaminas	Dimetilnitrosamina, dietilnitrosamina
Vários fármacos	Agentes alquilantes (p. ex., ciclofosfamida), dietilestilbestrol
Compostos de ocorrência natural	Dactinomicina, afatoxina B_1

Nota: Conforme listado acima, alguns fármacos utilizados como agentes quimioterápicos (p. ex., ciclofosfamida) podem ser carcinogênicos. O dietilestilbestrol era antigamente ingerido por mulheres como agente estrogênico; caso estivessem grávidas, algumas de suas filhas desenvolveriam câncer vaginal.



Benzo[a]pireno **2-Acetilaminofluoreno** ***N*-metil-4-aminoazobenzeno**

FIGURA 55-4 Estruturas de três carcinógenos químicos de amplo uso experimental.

das ações de várias espécies de citocromo P450 localizadas no retículo endoplasmático (RE) (ver Capítulo 53). Este fato é utilizado no ensaio de Ames (ver adiante), em que uma fração do sobrenadante pós-mitocondrial (contendo RE) é acrescentada ao sistema de ensaio como fonte de enzimas do citocromo P450.

A carcinogênese química compreende duas fases – a iniciação e a promoção. A iniciação refere-se ao estágio em que a exposição a determinado composto químico provoca lesão irreversível do DNA, e essa fase constitui um evento inicial necessário para que uma célula se torne cancerosa. A promoção compreende o estágio em que uma célula iniciada começa a crescer e proliferar. O efeito cumulativo desses estágios é uma neoplasia.

Os carcinógenos químicos podem ser identificados por triagem de sua mutagenicidade. Uma maneira simples de efetuar essa triagem consiste no **teste de Ames (Figura 55-6).** Esse teste relativamente simples, que detecta mutações em *Salmonella typhimurium* causadas por substâncias químicas, demonstrou ser muito valioso para propósitos de triagem. Um aperfeiçoamento do teste de Ames consiste em acrescentar uma parte de retículo endoplasmático (RE) ao ensaio para possibilitar a identificação de pró-carcinógenos. Pouquíssimos compostos, se houver algum, que foram negativos no teste de Ames demonstraram causar tumores em animais. Todavia, o ensaio em animais é necessário para demonstrar de modo inequívoco que uma determinada substância química é carcinogênica.

Convém assinalar que os compostos que alteram fatores epigenéticos (p. ex., estilbestrol), levando, talvez, ao desenvolvimento de câncer, não são positivos no teste de Ames, já que não são mutagênicos.

Aproximadamente 15% dos cânceres humanos podem ser causados por vírus

O estudo dos **vírus tumorais** contribuiu significativamente para a compreensão do câncer. Por exemplo, a descoberta dos oncogenes e dos genes supressores de tumor (ver adiante) emergiu de estudos de vírus oncogênicos. Foram identificados vírus tanto de DNA quanto de RNA que são capazes de causar câncer nos seres humanos (**Tabela 55-3**). Neste capítulo, não serão descritos os detalhes de como cada um desses vírus provoca câncer. Em geral, o material genético dos vírus é incorporado ao genoma da célula hospedeira. No caso de vírus de RNA, isso deve ocorrer após a transcrição reversa do RNA viral em DNA viral. Essa integração do DNA viral (o denominado provírus) com o DNA do hospedeiro resulta em vários eventos, como **desregulação do ciclo celular, inibição da apoptose e anormalidades das vias de sinalização da célula**. Todos esses eventos são discutidos posteriormente neste capítulo. Com frequência, os **vírus de DNA** atuam por meio de *down-regulation* dos genes supressores de tumor *P53* e *RB* (ver adiante). Os vírus de RNA frequentemente apresentam oncogenes em seus genomas; o processo pelo qual os oncogenes atuam para causar neoplasia maligna é discutido adiante. Foi estimado que cerca de 15% dos tumores humanos podem ser causados por vírus.

A. Carcinógeno direto → DNA

B. Pró-carcinógeno → (Enzima) Carcinógeno final → DNA

FIGURA 55-5 (A) Carcinógenos diretos e (B) indiretos. Os carcinógenos diretos podem interagir com o DNA sem ativação enzimática prévia. Os carcinógenos indiretos são ativados por uma enzima (p. ex.: uma espécie do citocromo P450) em carcinógenos finais que, em seguida, interagem com o DNA.

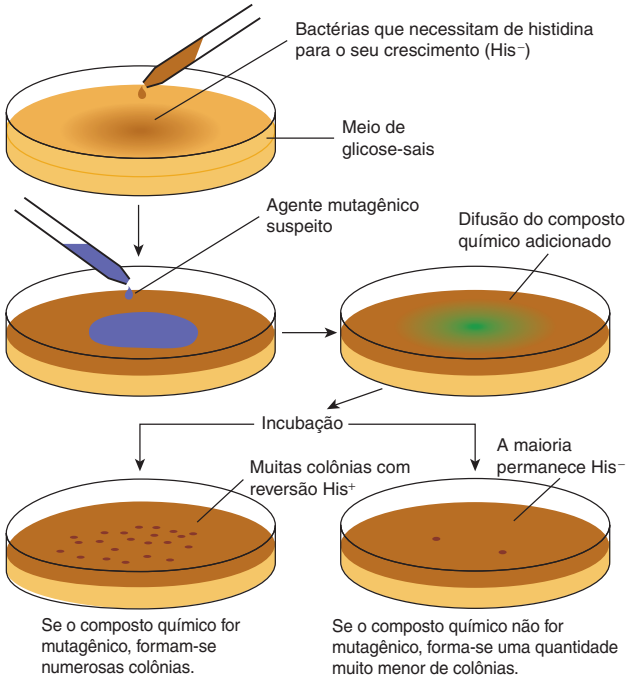


FIGURA 55-6 Teste de Ames para triagem de agentes mutagênicos. O composto químico testado irá aumentar a frequência de reversão de células His^- em células His^+ se for um agente mutagênico e, portanto, um carcinógeno potencial. A placa de controle (não ilustrada) contém o líquido no qual o agente mutagênico suspeito está dissolvido. Reproduzida, com autorização, de Nester EW et al.: *Microbiology: A Human Perspective.* 5th ed. McGraw-Hill, 2007.

TABELA 55-3 Alguns vírus que causam ou que estão associados a cânceres humanos

Vírus	Genoma	Câncer
Vírus Epstein-Barr	DNA	Linfoma de Burkitt, câncer de nasofaringe, linfoma de células B
Hepatite B	DNA	Carcinoma hepatocelular
Hepatite C	RNA	Carcinoma hepatocelular
Herpesvírus humano tipo I	DNA	Sarcoma de Kaposi
Vírus do papiloma humano (alguns tipos)	DNA	Câncer do colo do útero
Vírus da leucemia de células T humanas tipo 1	RNA	Leucemia de células T do adulto

Nota: Foi estimado que os cânceres humanos associados a vírus são responsáveis por ~15% da incidência total de cânceres.

OS ONCOGENES E OS GENES SUPRESSORES DE TUMOR DESEMPENHAM UM PAPEL FUNDAMENTAL NA PRODUÇÃO DO CÂNCER

Nos últimos 30 anos ou mais, foram realizados grandes avanços na compreensão dos processos pelos quais as células neoplásicas se desenvolvem e crescem. Dois achados fundamentais foram as descobertas dos **oncogenes** e dos **genes supressores de tumor**. Essas descobertas apontaram para mecanismos específicos pelos quais o crescimento e a divisão celulares podem ser perturbados, resultando em crescimento anormal. A **Figura 55-7** fornece um resumo dos efeitos globais dos oncogenes e da perda de atividade dos genes supressores de tumor.

Os oncogenes derivam de proto-oncogenes e codificam uma ampla variedade de proteínas que afetam o crescimento das células e a morte celular

Um **oncogene** pode ser definido como um gene alterado, cujo produto atua de maneira dominante para acelerar o crescimento celular ou a divisão da célula. Origina-se pela "ativação" de **proto-oncogenes** celulares normais (que codificam proteínas de estimulação do crescimento). Os mecanismos envolvidos nessa ativação estão relacionados na **Tabela 55-4**.

Proto-oncogenes → Oncogenes
Genes supressores de tumor → Inativados
→ → Taxa de crescimento → → → Câncer

FIGURA 55-7 Os oncogenes e a perda de atividade dos genes supressores de tumor direcionam o crescimento celular para o câncer. Os oncogenes codificam várias proteínas que podem estimular o crescimento de células neoplásicas; são derivados de proto-oncogenes. Os genes supressores de tumor codificam proteínas que normalmente suprimem o crescimento celular, mas que são inativados quando alterados por mutações. As moléculas de microRNA (não indicadas nesta figura) também são afetadas por mutações, e isso pode comprometer suas funções reguladoras normais. Além disso, alterações epigenéticas (não indicadas aqui) afetam a expressão dos genes e, portanto, o crescimento de células neoplásicas.

Essa tabela fornece um exemplo de **mutação pontual** que ocorre no oncogene *RAS*, que codifica uma GTPase pequena. A perda da atividade dessa proteína G (ver Capítulo 42) leva à estimulação crônica da atividade da adenilil-ciclase, resultando em proliferação celular. Outra forma de ativação de um oncogene ocorre pela **inserção de um promotor** (ver **Figura 55-8(A)**), em que a integração de um provírus retroviral (i.e., uma cópia de DNA do genoma de RNA de um vírus tumoral, como o vírus do sarcoma Rous, efetuada pela transcriptase reversa) ativa o *MYC*, um gene adjacente do hospedeiro. A produção excessiva da proteína codificada pelo *MYC* (um fator de transcrição) estimula a proliferação celular. Como indica a legenda da Figura 55-8(A), um tipo semelhante de efeito resulta da **inserção intensificadora**. As **translocações cromossômicas** são encontradas com muita frequência nas células neoplásicas, e foi documentada cerca de uma centena de exemplos diferentes. A translocação encontrada nos casos de linfoma de Burkitt está ilustrada na **Figura 55-8(B)**. O efeito global dessa translocação também consiste na ativação do *MYC*, resultando em proliferação celular. Outro mecanismo de ativação dos oncogenes consiste na **amplificação gênica**, que ocorre comumente em vários tipos de câncer. Nesse caso, são formadas múltiplas cópias de um oncogene, resultando em aumento da produção de uma proteína promotora do crescimento.

Após a ativação dos oncogenes, **como seus produtos proteicos atuam para promover o desenvolvimento do câncer?** A **Figura 55-9** mostra alguns dos mecanismos pelos quais eles operam. Alguns afetam as vias de sinalização celular (p. ex.: o produto de um oncogene pode atuar como fator de crescimento, receptor de fator de crescimento, proteína G ou molécula de sinalização distal).

TABELA 55-4 Mecanismos de ativação dos oncogenes

Mecanismo	Explicação
Mutação	Um exemplo clássico é a mutação pontual do oncogene *RAS*. Essa mutação resulta no produto gênico, uma GTPase pequena, a qual tem menor atividade nos tumores e na estimulação resultante da atividade da adenilil ciclase.
Inserção de promotor	A inserção de uma região promotora viral próxima a um gene resulta em sua ativação.
Inserção de intensificador	A inserção de uma região intensificadora viral próxima a um gene resulta em sua ativação.
Translocação cromossômica	A base consiste na ruptura de um segmento de um cromossomo e sua junção a outro. Os exemplos clássicos desse mecanismo são observados no linfoma de Burkitt (ver Figura 55-8) e no cromossomo Filadélfia (ver Glossário).
Amplificação gênica[1]	Ocorre multiplicação anormal de um gene, resultando em muitas cópias. Esse mecanismo pode ocorrer nos oncogenes, bem como em genes envolvidos na resistência tumoral a fármacos.

[1]A amplificação gênica pode ser reconhecida como regiões de coloração homogênea nos cromossomos ou como duplos cromossomos diminutos.

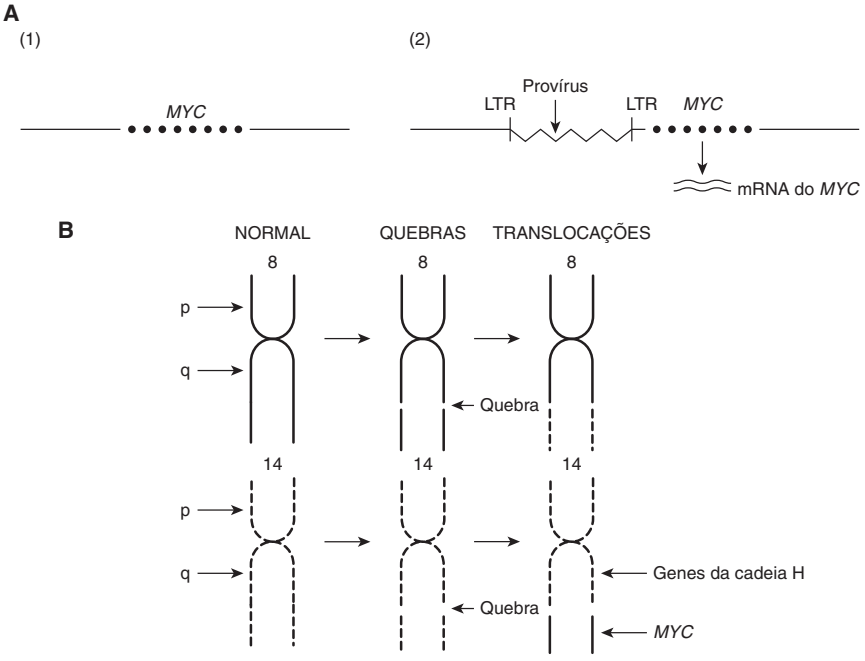


FIGURA 55-8 (A) Representação esquemática de como a inserção de um promotor pode ativar um proto-oncogene. (1) Cromossomo normal de galinha, mostrando um gene *MYC* inativo. (2) Um vírus de leucemia aviária foi integrado no cromossomo em sua forma proviral (uma cópia de DNA de seu genoma de RNA) adjacente ao gene *MYC*. A sua longa repetição terminal (LTR) à direita, que contém um promotor potente (ver Capítulo 36), localiza-se proximamente ao gene *MYC*, o ativando, resultando na transcrição do mRNA do *MYC*. Para simplificar, apenas uma fita de DNA está ilustrada, e outros detalhes foram omitidos. A inserção intensificadora atua de modo semelhante, exceto que o local de integração pode ser distal ou consideravelmente proximal e não pode atuar como promotor. Com efeito, uma sequência proviral específica atua como elemento intensificador (ver Capítulo 36), resultando em ativação do gene *MYC* e sua transcrição. **(B) Representação esquemática da translocação recíproca envolvida no linfoma de Burkitt.** Os cromossomos envolvidos são o 8 e o 14. Um segmento da extremidade do braço q do cromossomo 8 sofre ruptura e passa para o cromossomo 14. O processo inverso transfere um pequeno segmento do braço q do cromossomo 14 para o cromossomo 8. O gene *MYC* está contido em um pequeno segmento do cromossomo 8 que foi transferido para o cromossomo 14; portanto, está localizado próximo a genes que transcrevem as cadeias pesadas de moléculas de imunoglobulinas, e torna-se ele próprio ativado. Foram identificadas muitas outras translocações, das quais a mais conhecida seja, talvez, aquela envolvida na formação do cromossomo Filadélfia (ver Glossário).

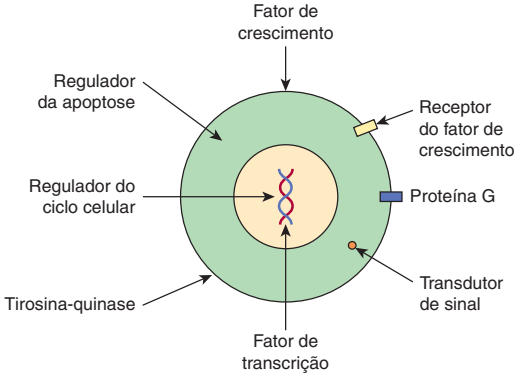


FIGURA 55-9 Algumas formas de atuação das proteínas codificadas por oncogenes. A figura fornece exemplos de várias proteínas codificadas por oncogenes. As proteínas estão relacionadas a seguir, com o oncogene correspondente entre parênteses, juntamente com o número OMIM. Um fator de crescimento, o fator de crescimento dos fibroblastos 3 (*INT2*, 164950); um receptor de fator de crescimento, o receptor do fator de crescimento epidérmico [EGFR] (*HER1*, 131550); uma proteína G (*H-RAS-1*, 190020); um transdutor de sinais (*BRAF*, 164757); um fator de transcrição (*MYC*, 190080); uma tirosina-quinase envolvida na adesão entre células (*SRC*, 190090); um regulador do ciclo celular (*PRAD*, 168461); um regulador da apoptose (*BCL2*, 151430).

Outros atuam por meio da alteração da transcrição ou da desregulação do ciclo celular. Outros ainda podem afetar as interações entre as células ou o processo da apoptose. Esses mecanismos ajudam a explicar muitas das principais características das células cancerosas apresentadas na Figura 55-1, como o seu potencial ilimitado de replicação, seus defeitos de sinalização, a sua capacidade de invasão e disseminação e o escape da apoptose.

Alguns **vírus tumorais** (p. ex.: os retrovírus) **contêm oncogenes**. Foi o estudo desses vírus tumorais (p. ex.: o vírus do sarcoma de Rous [RSV], um retrovírus) que revelou pela primeira vez a existência de oncogenes. Estudos posteriores mostraram que os oncogenes virais derivam de proto-oncogenes celulares que os vírus tumorais tinham apanhado durante a sua passagem pelas células hospedeiras.

Os genes supressores de tumor atuam para inibir o crescimento e a divisão celulares

Um **gene supressor de tumor** produz um produto proteico, que normalmente suprime o crescimento das células ou a divisão celular. Quando esse gene é alterado por alguma mutação, o efeito inibitório de seu produto é perdido ou diminuído, levando a um aumento do crescimento da célula ou de sua divisão. Conforme

inicialmente sugerido por AG Knudson, com base em estudos da herança dos retinoblastomas, ambas as cópias de um gene supressor de tumor precisam estar afetadas para perder seus efeitos inibitórios sobre o crescimento.

Foi feita uma distinção útil entre as funções de **guardião** e de **manutenção** dos genes supressores **de tumor.** Os genes com função de guardião **controlam a proliferação celular** e incluem principalmente genes que atuam para **regular o ciclo celular e a apoptose**. Os genes com função de manutenção estão relacionados com a **preservação da integridade do genoma** e incluem genes cujos produtos estão envolvidos no reconhecimento e na **correção da lesão do DNA** e manutenção da **integridade cromossômica** durante a divisão celular.

Atualmente, foram identificados muitos oncogenes e genes supressores de tumor. Apenas alguns serão mencionados aqui. A **Tabela 55-5** apresenta algumas diferenças entre os oncogenes e os genes supressores de tumor.

A **Tabela 55-6** fornece uma lista de algumas das propriedades de dois dos oncogenes (*MYC* e *RAS*) e de dois dos genes supressores de tumor (*P53* e *RB*) mais estudados.

Os estudos sobre o desenvolvimento dos cânceres colorretais elucidaram a participação de oncogenes e genes supressores de tumor específicos

Muitos tipos de tumores foram analisados quanto à presença de alterações genéticas. Uma das áreas mais produtivas nesse aspecto tem sido a análise do **desenvolvimento do câncer colorretal** por Vogelstein e colaboradores. Suas pesquisas, bem como a de outros, mostraram a participação de vários oncogenes e genes supressores de tumor no desenvolvimento do câncer humano. (O Caso nº 4 no Capítulo 57 descreve a história de um paciente com câncer colorretal.) Esses pesquisadores analisaram diversos oncogenes, genes supressores de tumor e alguns outros genes relevantes em amostras de **epitélio colônico normal**, do **epitélio displásico** (uma condição pré-neoplásica, caracterizada pelo desenvolvimento anormal do epitélio) e de vários estágios de **pólipos adenomatosos** e de **adenocarcinomas**. Alguns de seus principais achados estão resumidos na **Figura 55-10**. Nesta figura, pode-se constatar que determinados genes sofreram mutação em estágios relativamente específicos da sequência total ilustrada. As funções dos vários genes identificados estão listadas na **Tabela 55-7**. A **sequência global** de alterações pode variar ligeiramente daquela demonstrada, e outros genes também podem estar envolvidos. Estudos semelhantes foram realizados com vários **outros tumores humanos**, revelando padrões um tanto diferentes de ativação de oncogenes e mutações dos genes supressores de tumor. Outras mutações nesses genes, bem como em outros genes, estão envolvidas na **progressão do tumor**, um fenômeno pelo qual **clones** de células tumorais são selecionados para uma rápida taxa de crescimento e capacidade de disseminação. Assim, um tumor relativamente grande pode conter uma variedade de células com genótipos diferentes, tornando mais difícil o tratamento bem-sucedido.

Várias outras inferências podem ser feitas a partir desses resultados e daqueles de outros estudos semelhantes. Em primeiro lugar, a afirmação de que o câncer é realmente uma **doença genética**, porém em um sentido ligeiramente diferente do significado normal da expressão, na medida em que muitas das alterações gênicas são causadas por mutações somáticas. Em segundo lugar, a carcinogênese é, conforme assinalado anteriormente, um **processo em múltiplas etapas**. Estima-se que, na maioria dos casos, é necessária a ocorrência de mutação de um mínimo de cinco a seis genes para que ocorra câncer. Em terceiro lugar, acredita-se que mutações adicionais subsequentes possam conferir uma vantagem seletiva sobre os **clones** de células, alguns dos quais adquirem a capacidade de metastatizar com sucesso (ver adiante). Em quarto lugar, muitos dos genes implicados na carcinogênese do câncer colorretal e outros tipos de câncer estão envolvidos em **eventos de**

TABELA 55-5 Algumas diferenças entre os oncogenes e os genes supressores de tumor

Oncogenes	Genes supressores de tumor
A ocorrência de mutação em um dos dois alelos é suficiente	Ambos os alelos precisam estar afetados
Ganho de função de uma proteína que sinaliza a divisão celular	Perda da função de uma proteína
A mutação surge em células somáticas, não é herdada	A mutação está presente nas células germinativas (pode ser herdada) ou em células somáticas
Alguma preferência tecidual	Preferência tecidual frequentemente acentuada (p. ex., efeito do gene *RB* na retina)

Dados de Levine AJ: The p53 tumor suppressor gene. N Engl J Med 1992;326:1350.

TABELA 55-6 Algumas propriedades de oncogenes e genes supressores de tumor importantes

Nome	Propriedades
MYC	Um oncogene (OMIM 190080) que codifica um fator de ligação do DNA, que pode alterar a transcrição. Envolvido no crescimento celular, na progressão do ciclo celular e na replicação do DNA. Sofre mutação em uma variedade de tumores.
P53	Gene supressor de tumor (OMIM 191170), que responde a uma variedade de estresses celulares. Esse gene induz parada do ciclo celular, apoptose, senescência, reparo do DNA e está envolvido em alguns aspectos da regulação do metabolismo celular. Foi denominado "o guardião do genoma". Sofre mutação em cerca de 50% dos tumores humanos. A nomenclatura P53 refere-se à massa molecular aproximada da proteína codificada pelo *P53*, com base no cálculo a partir da SDS-PAGE.
RAS	Família de oncogenes que codificam GTPases pequenas. Foram inicialmente identificados como genes transformadores de determinados vírus do sarcoma murino. Os membros importantes da família são K-RAS (Kirsten), H-RAS (Harvey) (OMIM 190020) e N-RAS (neuroblastoma). A ativação persistente desses genes em decorrência de mutações contribui para o desenvolvimento de uma variedade de cânceres.
RB	Um gene supressor de tumor (OMIM 180200) que codifica a proteína RB. A RB regula o ciclo celular pela sua ligação ao fator de alongamento E2F. Reprime a transcrição de vários genes envolvidos na fase S do ciclo. A mutação do gene *RB* constitui a causa do retinoblastoma, mas também está envolvida na gênese de alguns outros tumores.

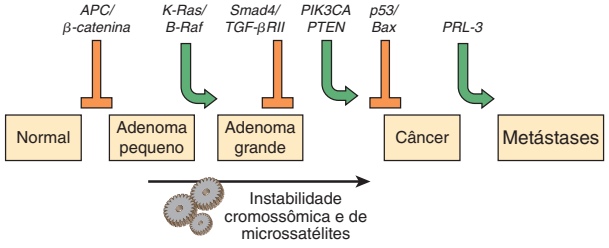


FIGURA 55-10 Alterações genéticas em múltiplas etapas associadas ao desenvolvimento do câncer colorretal. A ocorrência de mutações do gene *APC* inicia a formação de adenomas. A figura mostra uma sequência de mutações de um oncogene e de vários genes supressores de tumor, que podem resultar em progressão subsequente, com desenvolvimento de adenomas grandes e câncer. Os pacientes com polipose adenomatosa familiar (OMIM 175100) herdam mutações do gene *APC* e desenvolvem numerosos focos de criptas aberrantes (ACF) displásicas, alguns dos quais progridem à medida que adquirem as outras mutações assinaladas na figura. Os tumores de pacientes com câncer de colo hereditário não polipose (OMIM 120435) sofrem uma série semelhante, embora não idêntica, de mutações; a ocorrência de mutações no sistema de reparo de pareamento impróprio (ver Capítulo 35) acelera esse processo. O *K-RAS* é um oncogene, e os outros genes específicos indicados consistem em genes supressores de tumor. As localizações cromossômicas dos vários genes mostrados aqui são conhecidas. A sequência de eventos apresentada nesta figura não é invariável no desenvolvimento de todos os cânceres colorretais. Foi descrita uma variedade de outras alterações genéticas em uma pequena fração de cânceres colorretais avançados. Essas alterações genéticas podem ser responsáveis pela heterogeneidade das propriedades biológicas e clínicas observadas entre diferentes casos. Ocorre instabilidade de cromossomos e microssatélites (ver Capítulo 35) em muitos tumores, provavelmente envolvendo mutações em um número considerável de genes. (Reproduzida, com autorização, de Bunz F, Kinzler KW, Vogelstein B: Colorectal Tumors, Figura 48.2, The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease, www.ommbid.com)

sinalização celular, mostrando o papel central que as alterações da sinalização desempenham no desenvolvimento do câncer.

OS FATORES DE CRESCIMENTO E A OCORRÊNCIA DE ANORMALIDADES DE SEUS RECEPTORES E VIAS DE SINALIZAÇÃO DESEMPENHAM PAPÉIS IMPORTANTES NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER

Existem muitos fatores de crescimento

Foi identificada uma grande variedade de fatores de crescimento polipeptídicos que atuam nos tecidos e nas células dos seres humanos. Alguns desses fatores estão listados na **Tabela 55-8**. A seguir, será focada, principalmente, sua relação com o câncer.

Os fatores de crescimento podem atuar de modo **endócrino**, **parácrino** ou **autócrino** e afetar uma ampla variedade de células, produzindo uma **resposta mitogênica**. Conforme descrito anteriormente (Capítulo 52), esses fatores desempenham um importante papel na diferenciação das células hematopoiéticas.

TABELA 55-7 Alguns genes associados à carcinogênese colorretal

Gene[1]	Ação da proteína codificada
APC (OMIM 611731)	Antagoniza a sinalização de WNT[2]; quando sofre mutação, ocorre intensificação da sinalização de WNT, estimulando o crescimento celular
β-CATENINA (OMIM 116806)	Codifica a β-catenina, uma proteína presente nas junções de adesão, que são importantes na integridade dos tecidos epiteliais
K-RAS (OMIM 601599)	Envolvida na sinalização da tirosina-quinase
BRAF (OMIM 164757)	Uma serina/treonina-quinase
SMAD4 (OMIM 600993)	Afeta a sinalização pelo fator de transformação do crescimento β (TGF-β)
TGF-βRII	Atua como receptor do TGF-β[3]
PI3KCA (OMIM 171834)	Atua como subunidade catalítica da fosfatidilinositol-3-quinase
PTEN (OMIM 601728)	Uma proteína-tirosina-fosfatase com uma região de homologia da tensina, uma proteína que interage com filamentos de actina em adesões focais
P53 (OMIM 191170)	O produto, P53, é induzido na resposta à lesão do DNA e também é um fator de transcrição para muitos genes envolvidos na divisão celular (ver Tabela 55-10)
BAX (OMIM 600040)	Atua para induzir a morte celular (apoptose)
PRL3 (OMIM 606449)	Uma proteína-tirosina-fosfatase

Abreviaturas: *APC,* gene da polipose adenomatosa do colo; *BAX,* codifica a proteína X associada a BCL2 (BCL2 é um repressor da apoptose); *BRAF*, homólogo humano de um proto-oncogene aviário; *K-RAS,* gene associado a Kirsten-Ras; *PI3KCA,* codifica a subunidade catalítica da fosfatidilinositol-3-quinase; *PRL3,* codifica uma proteína-tirosina-fosfatase com homologia da PRL1, outra proteína-tirosina-fosfatase encontrada no fígado em regeneração; *PTEN,* codifica uma proteína-tirosina-fosfatase e um homólogo da tensina; *P53,* codifica um polipeptídeo com massa molecular de 53.000; *SMAD4,* o homólogo de um gene encontrado em *Drosophila*.

Nota: Os vários genes listados são oncogenes, genes supressores de tumor ou genes cujos produtos estão estreitamente associados aos produtos desses dois tipos de genes. Os efeitos cumulativos das mutações dos genes listados consistem em estimular a proliferação das células epiteliais do colo, que acabam se tornando cancerosas. Isso é conseguido principalmente por meio de efeitos exercidos em diversas vias de sinalização que afetam a proliferação celular. Outros genes e proteínas não listados aqui também estão envolvidos. Esta Tabela e a Figura 55-10 mostram claramente a importância do conhecimento detalhado da sinalização celular para a compreensão da gênese do câncer.

[1] *K-RAS* e *BRAF* são oncogenes; os outros genes listados são genes supressores de tumor ou genes cujos produtos estão associados às ações dos produtos dos genes supressores de tumor.

[2] A família WNT de glicoproteínas secretadas está envolvida em uma variedade de processos de desenvolvimento. A tensina é uma proteína que interage com filamentos de actina em adesões focais.

[3] TGF-β é um polipeptídeo (um fator de crescimento) que regula a proliferação e a diferenciação de muitos tipos de células.

Existem também **fatores inibitórios do crescimento**. Por exemplo, o fator de transformação do crescimento beta (TGF-β) exerce efeitos inibitórios sobre o crescimento de determinadas células. Portanto, a exposição crônica a quantidades aumentadas de um fator de crescimento ou a quantidades diminuídas de um fator inibitório do crescimento pode alterar o equilíbrio do crescimento celular.

TABELA 55-8 Alguns fatores de crescimento polipeptídicos

Fator de crescimento	Funções
Fator de crescimento epidérmico (EGF)	Estimula o crescimento de numerosas células epidérmicas e epiteliais
Eritropoietina (EPO)	Regula o desenvolvimento das células eritropoiéticas no estágio inicial
Fatores de crescimento dos fibroblastos (FGF)	Promovem a proliferação de muitas células diferentes
Interleucinas	As interleucinas exercem uma variedade de efeitos sobre as células do sistema imune
Fator de crescimento neuronal (NGF)	Efeito trófico sobre determinados neurônios
Fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF)	Estimula o crescimento das células mesenquimais e gliais
Fator de transformação do crescimento alfa (TGFα)	Semelhante ao EGF
Fator de transformação do crescimento beta (TGFβ)	Exerce efeitos tanto estimuladores quanto inibitórios sobre determinadas células

Foram identificados muitos outros fatores de crescimento. Estes podem ser produzidos por uma variedade de células ou podem ter principalmente uma fonte de produção. Atualmente, foram isoladas muitas interleucinas diferentes; juntamente com os interferons e algumas outras proteínas/polipeptídeos, são designadas como citocinas.

Os fatores de crescimento atuam por meio de receptores específicos e sinalização transmembrana para afetar as atividades de genes específicos

Os fatores de crescimento produzem seus efeitos por meio de interação com **receptores específicos** presentes nas superfícies celulares, desencadeando **vários eventos de sinalização** (Capítulo 42). Muitos receptores de fatores de crescimento já foram clonados. Em geral, apresentam segmentos curtos que atravessam a membrana de um lado ao outro, bem como domínios externos e citoplasmáticos. Alguns desses receptores (p. ex., aqueles para o fator de crescimento epidérmico [EGF], para a insulina e para o fator de crescimento derivado das plaquetas [PDGF]) exibem atividades de **tirosina-quinase**. A atividade de quinase, que está localizada nos domínios citoplasmáticos, provoca autofosforilação da proteína receptora e também fosforila algumas outras proteínas.

A análise do mecanismo de ação do **PDGF** ilustra como um determinado fator de crescimento produz seus efeitos. A interação do PDGF com o seu receptor estimula a atividade da fosfolipase C. Como resultado, ocorre clivagem do fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) em inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG) (ver Figura 42-6). O aumento do IP_3 estimula a liberação do Ca^{2+} intracelular, e o DAG aumenta a atividade da proteinoquinase C (PKC). A hidrólise do DAG pode liberar ácido araquidônico, o qual é capaz de estimular a produção de prostaglandinas e leucotrienos, ambos os quais exercem vários efeitos biológicos. A exposição de células-alvo ao PDGF pode levar a uma rápida ativação (de poucos minutos a 1 a 2 h) de determinados proto-oncogenes celulares (p. ex., *MYC* e *FOS*), que participam na estimulação da mitose por meio de efeitos sobre o ciclo celular (ver adiante). O aspecto básico é o fato de que os fatores de crescimento interagem com receptores específicos, os quais estimulam vias de sinalização específicas para aumentar ou diminuir as atividades de vários genes que afetam a divisão celular.

MUITOS TIPOS DE CÂNCER PODEM SER PREVENIDOS PELA MODIFICAÇÃO DOS FATORES DE RISCO

Os **fatores de risco modificáveis** têm sido associados a uma ampla variedade de tipos de câncer. Foi estimado que é possível prevenir mais da metade de todos os cânceres nos países desenvolvidos se forem introduzidas as medidas listadas na **Tabela 55-9** em uma base populacional ampla. O **tabagismo** ainda representa uma importante causa de câncer no mundo inteiro. Nunca é demais enfatizar que a **prevenção** e a **detecção precoce do câncer** constituem a abordagem mais crítica para que a doença seja derrotada.

AS ANORMALIDADES DO CICLO CELULAR SÃO UBÍQUAS NAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS

É necessário dispor de um conhecimento do **ciclo celular** para compreender muitos dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do câncer. Esse conhecimento é também importante devido ao fato de que muitos fármacos antineoplásicos só atuam contra células que estão em divisão ou que se encontram em determinada fase do ciclo.

Os aspectos básicos do ciclo celular foram descritos no Capítulo 35. Conforme ilustrado na Figura 35-20, o ciclo tem quatro fases: G_1, S, G_2 e M. Se as células não estiverem no ciclo, elas se encontram na fase G_0 e são denominadas quiescentes. Elas podem ser recrutadas para o ciclo a partir da fase G_0 por várias influências (p. ex., determinados fatores de crescimento). O tempo de geração é o tempo necessário para que uma célula na fase G_0 entre no ciclo e produza duas células-filhas. As células de um câncer geralmente possuem um menor tempo de geração do que as células normais, e existe uma menor quantidade delas na fase G_0.

TABELA 55-9 Medidas passíveis de prevenir cerca de 50% dos cânceres se forem introduzidas em uma base populacional ampla

- Reduzir o uso de tabaco
- Aumentar a atividade física
- Controlar o peso
- Melhorar a dieta
- Limitar o consumo de álcool
- Adotar práticas sexuais mais seguras
- Efetuar testes de triagem de rotina para câncer
- Evitar a exposição excessiva ao sol

Dados de Stein CJ, Colditz GA: Modifiable risk factors for cancer. Brit J Cancer 90:299 (2004).

Os papéis de várias **ciclinas**, **quinases dependentes de ciclinas** (CDK) e várias **outras moléculas importantes** que afetam o ciclo celular (p. ex., os genes *RB* e *P53*) também estão descritos no Capítulo 35. Os pontos no ciclo onde algumas dessas moléculas atuam estão indicados na Figura 35-21 e na Tabela 35-7.

Como uma das principais propriedades das células neoplásicas consiste em seu **crescimento descontrolado**, muitos aspectos de seu **ciclo celular** foram estudados detalhadamente, porém apenas alguns dos resultados são mencionados aqui. Foram descritas diversas mutações que afetam as **ciclinas** e as **CDK**. Muitos produtos dos **proto-oncogenes** e dos **genes supressores de tumor** desempenham importantes papéis na regulação do ciclo normal. Foi identificada uma ampla variedade de mutações nesses tipos de genes, incluindo *RAS, MYC, RB, P53* (que estão entre os mais estudados, ver adiante), e muitos outros.

Por exemplo, conforme discutido no Capítulo 35, o produto proteico do **gene *RB*** é um regulador do ciclo ativo. Esse produto atua por meio de sua ligação ao fator de transcrição E2F, bloqueando a progressão da célula da fase G1 para a fase S. Desta forma, a perda da proteína RB em consequência de mutações remove esse elemento de controle do ciclo celular.

Quando ocorre lesão do DNA (por radiação ou substâncias químicas), a **proteína P53** aumenta quantitativamente e ativa a transcrição de genes que retardam o trânsito pelo ciclo celular. Se a lesão for muito severa, impossibilitando o seu reparo, a P53 ativa genes que causam apoptose (ver adiante). Se a P53 estiver ausente ou inativa devido a mutações, não ocorre apoptose, e as células com DNA lesionado persistem, tornando-se, talvez, progenitoras de células neoplásicas.

A INSTABILIDADE GENÔMICA E A ANEUPLOIDIA CONSTITUEM CARACTERÍSTICAS IMPORTANTES DAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS

Conforme assinalado anteriormente, bem como mais adiante neste capítulo, as células neoplásicas apresentam numerosas mutações. Uma possível explicação para essa **instabilidade genômica** é o fato de que essas células apresentam um **fenótipo mutador**. A princípio, Loeb e colaboradores postularam que esse fato resultava da aquisição, pelas células neoplásicas, de mutações de genes envolvidos na **replicação do DNA** e no **reparo do DNA**, possibilitando, assim, o acúmulo de mutações. Posteriormente, esse conceito foi ampliado para incluir mutações que afetam a **segregação dos cromossomos, vigilância de dano do DNA** e processos como a **apoptose**.

O termo instabilidade genômica é muitas vezes empregado para referir-se a duas anormalidades apresentadas por numerosas células neoplásicas: a **instabilidade de microssatélites** e a **instabilidade cromossômica** (**CI**). A **instabilidade de microssatélites** foi descrita de modo sucinto no Capítulo 35, ela envolve a expansão ou contração de microssatélites, com frequência devido a anormalidades de reparo de pareamento desigual ou deslizamento de replicação. A **CI** ocorre mais frequentemente do que a instabilidade de microssatélites, e as duas geralmente se excluem mutuamente. Refere-se ao ganho ou à perda de cromossomos causados por anormalidades da segregação dos cromossomos durante a mitose.

Outro campo de interesse em relação à CI é a **variação no número de cópias** (CNV) (ver o Glossário). Foram identificadas associações de diversas CNV em muitos tipos de câncer, e o seu papel preciso no câncer está em fase de pesquisa.

Um importante aspecto da CI é a **aneuploidia**, uma característica muito comum dos tumores sólidos. Ocorre aneuploidia quando o número de cromossomos de uma célula não é um múltiplo do número haploide. O grau de aneuploidia está frequentemente correlacionado com um **prognóstico pouco favorável**. Esse fato sugeriu que as anormalidades da segregação cromossômica podem contribuir para a progressão do tumor, aumentando a diversidade genética. Alguns cientistas acreditam que a aneuploidia seja um aspecto fundamental do câncer.

Muitas pesquisas estão sendo realizadas para determinar a base da CI e da aneuploidia. Conforme ilustrado na **Figura 55-11**, vários processos diferentes estão envolvidos na segregação normal dos cromossomos. Cada um dos processos indicados é complexo, envolvendo diversas organelas, bem como muitas proteínas individuais. O leitor deveria consultar um livro de Biologia Celular para obter mais detalhes desses processos importantes. Existem estudos em andamento para comparar esses processos nas células normais e tumorais e para determinar quais das diferenças detectadas podem contribuir para a CI e para a aneuploidia. A esperança nessa linha de pesquisa é que seja possível **desenvolver fármacos** capazes de diminuir ou até mesmo de impedir a CI e a aneuploidia.

MUITAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS EXIBEM NÍVEIS ELEVADOS DE ATIVIDADE DA TELOMERASE

Há considerável interesse na participação dos telômeros (ver Capítulo 35) em diversas doenças, bem como no processo de envelhecimento. No que diz respeito ao câncer, quando as células tumorais se dividem rapidamente, frequentemente ocorre um encurtamento de seus telômeros. Esses telômeros (em geral, detectados nos leucócitos, em virtude de sua facilidade de obtenção) foram implicados como fator de risco para muitos tumores sólidos (p. ex., câncer de mama). Os **telômeros curtos** parecem ter valor preditivo no que concerne à progressão de doenças inflamatórias crônicas (como a colite ulcerativa e o esôfago de Barrett) para o câncer. A ocorrência de anormalidades na estrutura e na função dos telôme-

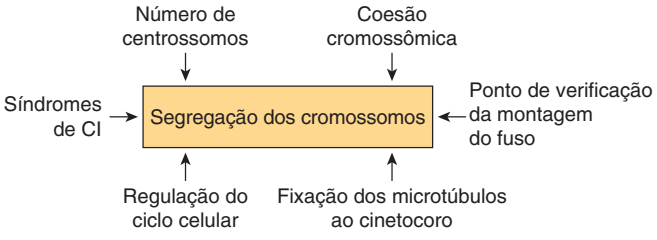


FIGURA 55-11 Alguns fatores envolvidos na segregação cromossômica que são importantes para a compreensão da instabilidade cromossômica (CI) e da aneuploidia. As síndromes de CI incluem a síndrome de Bloom (OMIM 210900) e outras. (Com base em Thompson SL et al.: Mechanisms of chromosomal instability. Curr Biol 2010;20(6):R285.)

ros pode contribuir para a CI (ver anteriormente). A atividade da **telomerase**, a principal enzima envolvida na síntese dos telômeros, muitas vezes está elevada nas células neoplásicas, proporcionando um mecanismo para superar o encurtamento dos telômeros. Inibidores seletivos da telomerase foram considerados como possíveis fármacos para o tratamento do câncer, porém essa possibilidade ainda não se manifestou em uso clínico bem-sucedido.

DIVERSOS TIPOS DE CÂNCER APRESENTAM UMA PREDISPOSIÇÃO HEREDITÁRIA

Sabe-se, há muitos anos, que determinados tipos de câncer têm uma base hereditária. Estima-se que cerca de 5% dos cânceres estejam incluídos nessa categoria. A descoberta dos oncogenes e dos genes supressores de tumor possibilitou a pesquisa da base desse fenômeno. Atualmente, são reconhecidos muitos tipos hereditários de câncer, e apenas alguns deles estão listados na **Tabela 55-10**. Em vários casos, quando há suspeita de uma síndrome hereditária, uma triagem genética apropriada das famílias possibilita a realização de uma intervenção precoce. Por exemplo, algumas mulheres jovens que herdaram um gene *BRCA1* ou *BRCA2* com mutação optaram por uma mastectomia profilática para evitar a ocorrência de câncer de mama posteriormente durante a vida.

O SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO GENOMA DAS CÉLULAS TUMORAIS ESTÁ FORNECENDO NOVAS INFORMAÇÕES A RESPEITO DO CÂNCER

Desde a conclusão do Projeto Genoma Humano, a tecnologia do sequenciamento em larga escala e a análise e interpretação dos dados de sequência avançaram consideravelmente. O sequenciamento tornou-se muito mais barato, o que possibilitou a realização de estudos com o objetivo de efetuar o **sequenciamento completo dos genomas de um grande número de diferentes tipos de tumores**. Dessa maneira, um **catálogo** abrangente dos tipos e das quantidades de mutações encontradas em vários tipos de cânceres estará disponível em breve. Espera-se que esses estudos levem a resultados que também terão impacto nos **exames diagnósticos**, identificando novos **biomarcadores prognósticos** úteis. Esses estudos também deverão revelar a participação de **muitos genes novos** na carcinogênese, dos quais alguns poderão fornecer uma orientação para novas abordagens terapêuticas. Até o momento, **foram identificados cerca de 350 genes envolvidos no câncer**, e a previsão é de que possam existir até 2000. É particularmente interessante identificar mutações de genes que causam e aceleram cânceres; essas mutações são conhecidas como mutações **causais** (**condutoras**), enquanto outras mutações são descritas como mutações **passageiras**.

Estudos realizados com vários tipos de câncer já forneceram resultados interessantes. Por exemplo, em um estudo do DNA de um indivíduo que sofre de **leucemia mielocítica aguda**, foram detectadas cerca de 750 mutações somáticas. Apenas 12 dessas mutações ocorreram em genes que codificam proteínas ou RNA reguladores; as mutações desses genes têm mais tendência a exercer efeitos graves. (As áreas de codificação do genoma ocupam apenas cerca de 2% do DNA genômico.) A ocorrência de mutações em outros locais genômicos pode ou não ter consequências. O sequenciamento completo do genoma em sete cânceres primários de próstata em seres humanos surpreendentemente revelou a presença de muitos rearranjos genômicos.

Um exemplo fascinante da informação que pode ser obtida pelo sequenciamento do genoma de cânceres é fornecido pelos resultados de um estudo recente de **carcinomas de pâncreas**, considerado um dos cânceres mais fatais. Entretanto, ainda não foi estabelecido se a sua letalidade decorre de sua **agressividade** (capacidade de metastatizar e crescer) ou de seu **estabelecimento tardio do diagnóstico**. Nesse estudo, foi efetuado o sequen-

TABELA 55-10 Algumas condições hereditárias do câncer

Condição	Gene	Principal função	Principais manifestações clínicas
Polipose adenomatosa do colo (OMIM 175100)	*APC*	Ver Tabela 55-7	Desenvolvimento de muitos pólipos adenomatosos de início precoce, os quais são precursores imediatos do câncer colorretal
Câncer de mama 1 de início precoce (OMIM 113705)	*BRCA1*	Reparo do DNA	Cerca de 5% das mulheres na América do Norte com câncer de mama apresentam mutações desse gene ou do *BRCA2*. Aumenta também substancialmente o risco de câncer de ovário
Câncer de mama 2 de início precoce (OMIM 600185)	*BRCA2*	Reparo do DNA	Descrito para o *BRCA1*. As mutações desse gene também aumentam o risco de câncer de ovário, porém em menor grau
Câncer hereditário não polipose tipo 1 (OMIM 120435)	*MSH2*	Reparo de pareamento desigual do DNA	Início precoce de câncer colorretal
Síndrome de Li-Fraumeni (OMIM 151623)	*P53*	Ver Tabela 55-6	Síndrome rara envolvendo cânceres em diferentes locais, desenvolvendo-se em uma idade precoce
Neurofibromatose tipo 1 (OMIM 162200)	*NF1*	Codifica a neurofibromina	Varia desde algumas manchas de café-com-leite até o desenvolvimento de milhares de neurofibromas
Retinoblastoma (OMIM 180200)	*RB1*	Ver Tabela 55-6	[1]Retinoblastoma hereditário ou esporádico

Foram também identificadas muitas outras condições hereditárias com câncer.
[1]No retinoblastoma hereditário, ocorre mutação de um alelo na linhagem germinativa, exigindo apenas uma mutação subsequente para o desenvolvimento de tumor. No retinoblastoma esporádico, nenhum dos alelos sofre mutação ao nascimento, de modo que é necessária a ocorrência de mutações subsequentes em ambos os alelos.

ciamento dos genomas de sete cânceres primários de pâncreas, e os genomas das metástases foram obtidos na necropsia. Em cada uma das metástases, foram detectadas aproximadamente 61 mutações conhecidas relacionadas com câncer. Utilizando uma técnica de "relógio molecular", emprestada da biologia evolutiva, foi calculado o tempo levado por essas metástases para acumular as mutações. Isso foi possível graças ao conhecimento prévio da sequência global das mutações. Segundo os cálculos, decorreram **pouco mais de 10 anos** desde o momento da mutação inicial até o desenvolvimento de tumores primários não metastáticos do pâncreas. Foi necessário **outro período de mais cinco anos** para esses tumores adquirirem o seu potencial metastático. Depois disso, **cerca de dois anos** transcorrem para que os tumores metastatizem, levando à morte. Por conseguinte, foi sugerido que a evolução de muitos cânceres de pâncreas é um **processo relativamente lento**, e que esses tipos de câncer de pâncreas não são altamente agressivos. O problema reside na dificuldade de seu diagnóstico. A esperança está em métodos como a **detecção de mutações em células de câncer de pâncreas presentes em amostras de fezes**, no desenvolvimento de **novos biomarcadores sanguíneos** para o câncer de pâncreas e, talvez, em **novas técnicas de imagem**, as quais irão possibilitar um **diagnóstico precoce**, que constitui sempre um fator crítico no tratamento do câncer. Dentro de relativamente poucos anos, deverão estar disponíveis **dados de sequenciamento completo** dos genomas de **muitos tipos importantes de tumores**, e espera-se que haja um considerável avanço na compreensão da biologia básica do câncer, bem como no fornecimento de informações relevantes para um melhor planejamento de fármacos e tratamento menos tóxico.

Diferentemente dos estudos de sequenciamento de genes, houve muitos relatos de participação de **microRNA** no câncer. Em virtude de sua importância em muitos aspectos do controle dos genes, o estudo dessas moléculas já está constituindo um importante campo na pesquisa do câncer.

Várias centenas de tipos de câncer foram identificadas por histopatologia clássica. Assim, **o câncer não é uma única doença**. O trabalho realizado no sequenciamento do genoma de cânceres, revelando uma grande quantidade de mutações nas células neoplásicas, sugere que pode não haver apenas centenas de cânceres diferentes, mas que, na realidade, **cada câncer pode ser geneticamente diferente**.

AS CÉLULAS NEOPLÁSICAS APRESENTAM ANORMALIDADES DA APOPTOSE QUE PROLONGAM A SUA SOBREVIDA

A apoptose é um programa geneticamente regulado que, quando ativado, provoca morte celular. As principais moléculas envolvidas consistem em enzimas proteolíticas, denominadas **caspases**, que normalmente ocorrem na forma de **procaspases** inativas. O termo caspase reflete que essas enzimas são cisteína proteases que clivam ligações peptídicas na extremidade C-terminal de resíduos de aspartato. Foram identificadas cerca de 15 caspases humanas, embora nem todas tenham uma participação no processo de apoptose. Quando as caspases envolvidas na apoptose são ativadas (principalmente 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10), elas atuam em uma **cascata** de eventos (comparar com a cascata da coagulação, Capítulo 51) que finalmente mata as células por meio da digestão de várias proteínas e outras moléculas. As caspases **proximais** (p. ex., 2, 8 e 10), no início da cascata, são frequentemente denominadas **iniciadoras**, enquanto aquelas distais, no final da via, (p. ex., 3, 6 e 7) são denominadas **efetoras** ou **executoras**. A **DNase ativada por caspase** (CAD) fragmenta o DNA, produzindo um padrão característico em escada detectado por eletroforese. As **características microscópicas** da apoptose incluem a condensação da cromatina, mudanças do formato do núcleo e formação de bolhas na membrana. As células mortas são rapidamente eliminadas por atividade fagocítica, evitando uma reação inflamatória.

A apoptose difere da **necrose,** forma patológica de morte celular não geneticamente programada. Ocorre necrose após exposição a agentes externos, como determinadas substâncias químicas e calor extremo (p. ex., queimaduras). Várias enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases, nucleases, etc) estão envolvidas na necrose. A liberação do conteúdo celular das células que estão morrendo pode causar inflamação local, ao contrário da apoptose.

O processo global da apoptose é **complexo** e trata-se de uma questão de vida e morte que é **rigorosamente regulado**. O processo inclui proteínas que atuam como receptores, adaptadores, procaspases e caspases e fatores pró e antiapoptóticos. Existem **vias extrínseca** e **intrínseca**, e as **mitocôndrias** são organelas importantes que participam da via intrínseca.

A **Figura 55-12** apresenta um esquema muito simplificado de alguns dos eventos-chave no processo da apoptose. Duas vias principais estão envolvidas: a via dos receptores de morte celular (extrínseca) e a via mitocondrial (intrínseca).

As principais características da **via dos receptores de morte celular** estão ilustradas no lado esquerdo da Figura. Os **sinais externos** que iniciam o processo de apoptose incluem a citocina, o fator de necrose tumoral α (TNF-α), e o ligante FAS. Foram identificados vários receptores de morte celular, os quais consistem em proteínas transmembrana, e alguns interagem com **proteínas adaptadoras** (como FADD). Por sua vez, esses complexos interagem com a **procaspase-8**, resultando na sua conversão em **caspase-8** (uma caspase iniciadora). A **caspase-3** (uma caspase efetora) é ativada por uma série de reações subsequentes. Ela digere proteínas estruturais importantes, como a lâmina (associada à condensação nuclear), várias proteínas do citoesqueleto e enzimas envolvidas no reparo do DNA, causando morte celular.

A **regulação** dessa via ocorre em vários níveis. A **FLIP** inibe a conversão da procaspase-8 em sua forma ativa. Os **inibidores da apoptose** (IAP) inibem a conversão da procaspase-3 em sua forma ativa. Esses efeitos podem ser dominados pela proteína **SMAC,** que é liberada das mitocôndrias.

A **via mitocondrial** pode ser iniciada pela exposição a espécies reativas de oxigênio, dano ao DNA e outros estímulos. Resulta na formação de poros na membrana mitocondrial externa, através dos quais o **citocromo c** escapa para o citoplasma, onde interage com **APAF-1**, **procaspase-9** e **ATP,** formando um complexo multiproteico, conhecido como **apoptossomo**. Como resultado dessa interação, a **procaspase-9** é convertida em sua forma ativa, que, por sua vez, atua na **procaspase-3** para produzir a **caspase-3**.

Quanto à **regulação**, a ativação do **gene *P53*** causa *up-regulation* a transcrição de ***BAX***. A **BAX** é pro-apoptótica, uma vez

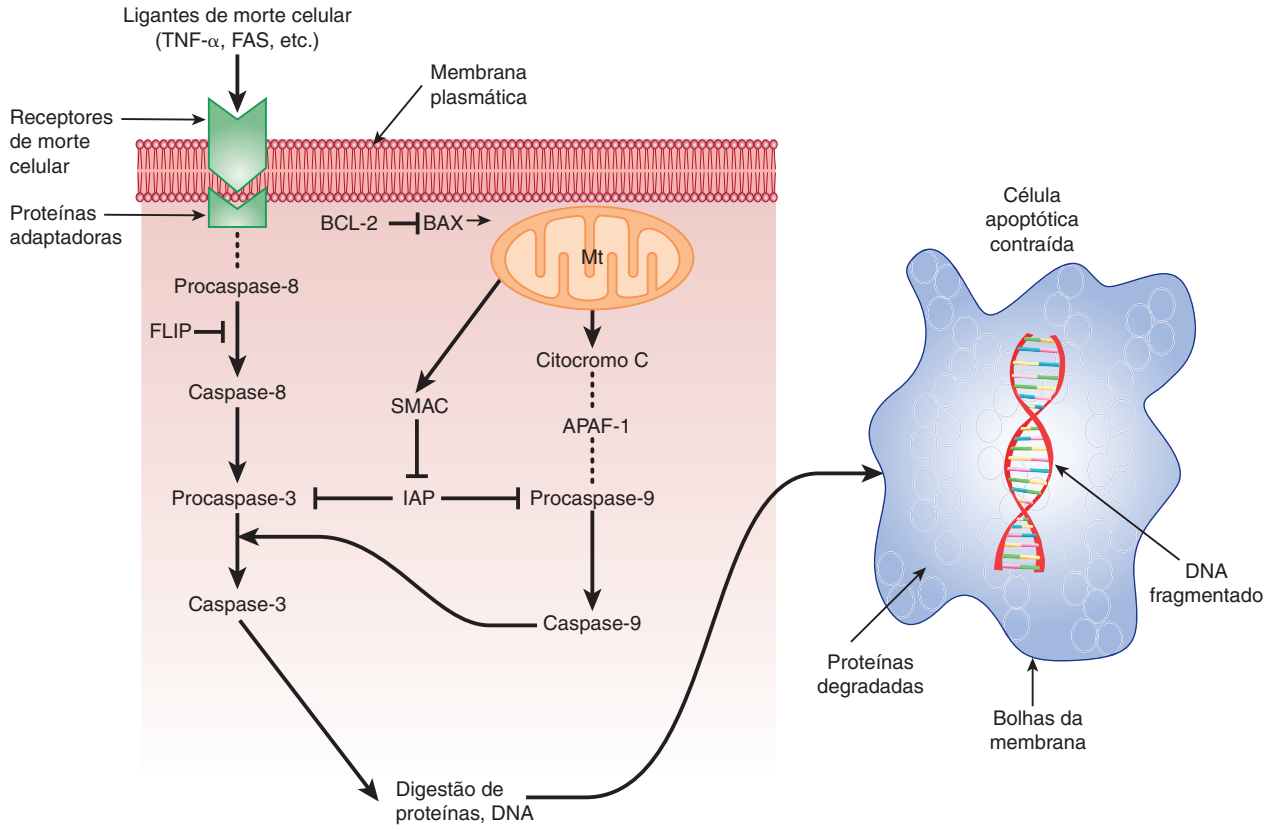


FIGURA 55-12 Esquema simplificado da apoptose. O lado esquerdo representa os principais eventos da via extrínseca. Os sinais de morte celular incluem o TNF-α e o FAS (presentes na superfície dos linfócitos e de algumas outras células). Os sinais (ligantes) interagem com receptores específicos de morte celular (existem vários deles). Em seguida, o receptor ativado interage com uma proteína adaptadora (FADD é uma de várias dessas proteínas) e forma, então, um complexo com a procaspase-8. (O complexo está indicado por ¨ entre o receptor e a procaspase-8 na Figura.) Por meio de uma série de etapas adicionais, ocorre formação da caspase-3 ativa, que constitui o principal efetor (executor) de lesão celular. A regulação da via extrínseca pode ocorrer devido ao efeito inibitório da FLIP sobre a conversão da procaspase-8 em caspase-8, bem como devido ao efeito inibitório do IAP sobre a procaspase-3. O lado direito representa os principais eventos que ocorrem na via intrínseca (mt). Vários estresses celulares afetam a permeabilidade da membrana mt externa, resultando no efluxo do citocromo c para o citoplasma. O citocromo c forma um complexo multiproteico com o APAF-1 e com a procaspase-9, denominado apoptossomo. Por meio dessas interações, a procaspase-9 é convertida em caspase 9. Por sua vez, a caspase-9 pode atuar sobre a procaspase-3, convertendo-a em sua forma ativa. A regulação da via intrínseca pode ocorrer em nível da BAX, o que facilita o aumento da permeabilidade mt, possibilitando o efluxo do citocromo c, sendo, portanto, pró-apoptótica. A BCL-2 opõe-se a esse efeito da BAX e, por isso, é antiapoptótica. O IAP também inibe a procaspase-9, e esse efeito do IAP pode ser superado pelo SMAC. (APAF-1, fator de ativação da protease apoptótica-1; BAX, proteína X associada a BCL-2; BCL-2, célula B de LLC/linfoma 2 [LLC representa leucemia linfática crônica]; FADD, domínio de morte associado a FAS; FAS, antígeno FAS; FLICE, ICE semelhante a FADD; FLIP, proteína inibitória de FLICE; IAP, inibidor das proteínas da apoptose; ICE, interleucina-1-β convertase; SMAC, segundo ativador de caspase derivado de mitocôndria.)

que provoca perda do potencial de membrana mitocondrial, ajudando a iniciar a via apoptótica mitocondrial. Por outro lado, a **BCL-2** inibe a perda do potencial de membrana e, portanto, é antiapoptótica. As **IAP** inibem a conversão da procapase-9 em caspase-9, e essa ação pode ser superada pelo **SMAC**.

As células neoplásicas escapam da apoptose

As **células neoplásicas** desenvolveram **mecanismos de evasão da apoptose** e, portanto, continuam crescendo e dividindo-se. Em geral, esses mecanismos resultam de mutações que provocam perda da função de proteínas pró-apoptóticas ou da expressão excessiva de genes antiapoptóticos. Um desses exemplos é fornecido pela perda de função do **gene *P53***, talvez o gene que mais comumente sofre mutação no câncer. A consequente perda de *up-regulation* do ***BAX*** pró-apoptótico (ver anteriormente) desvia o equilíbrio a favor das proteínas antiapoptóticas. A **superexpressão** de muitos genes antiapoptóticos constitui um achado frequente nos cânceres. A consequente evasão da apoptose favorece o crescimento contínuo de cânceres. Esforços estão sendo realizados para desenvolver **fármacos** ou **outros compostos** que irão estimular especificamente a apoptose nas células neoplásicas, levando à sua morte.

Conforme assinalado anteriormente, a apoptose é uma **via complexa de múltipla regulação**, com numerosos componentes participantes, os quais não são todos mencionados nessa descrição simplificada. A via da apoptose também está envolvida em diversos processos fisiológicos e de desenvolvimento. Embora pareça ser paradoxal, a regulação da morte celular é tão importante na manutenção da saúde quanto na formação de novas

células. Além do câncer, a apoptose também está implicada em outras doenças, incluindo determinadas doenças autoimunes e distúrbios neurológicos crônicos, como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson, nas quais a ocorrência de **morte celular excessiva** (mais do que um crescimento excessivo) constitui uma característica.

A **Tabela 55-1** fornece o resumo de algumas das principais características da apoptose.

MECANISMOS EPIGENÉTICOS ESTÃO ENVOLVIDOS NO CÂNCER

Há evidências crescentes de que os mecanismos epigenéticos (ver Capítulo 36) estejam envolvidos na etiologia do câncer. A **metilação de bases de citosina específicas** nos genes está implicada na supressão das atividades de determinados genes. Foram identificadas alterações do processo normal de metilação/desmetilação dos resíduos de citosina de genes específicos em células neoplásicas. As **modificações pós-tradução das histonas**, como acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação, também afetam a expressão dos genes. Foram detectadas alterações da **acetilação das histonas H3 e H4**, afetando a transcrição dos genes em células neoplásicas. As mutações que acometem as estruturas de complexos proteicos (p. ex., os complexos SW1/SNF) envolvidos na **remodelagem da cromatina** também podem afetar a transcrição dos genes. Com efeito, vários dos componentes dos complexos SW1/SNF podem atuar como genes supressores de tumor. A **Figura 55-13** fornece um resumo de alguns desses aspectos da epigenética.

Um aspecto de interesse particular no que diz respeito às alterações epigenéticas é o fato de que muitas delas são potencialmente **reversíveis**. Nessa perspectiva, a **5′-azadesoxicitidina** é um inibidor das metiltransferases, enquanto o **ácido suberoilanilida hidroxâmico** (SAHA, Vorinostat) atua na desacetilação das histonas. Ambos os agentes foram utilizados no tratamento de determinados tipos de leucemias e linfomas.

O uso progressivo de **técnicas de triagem** para o estudo das alterações epigenéticas (p. ex., análise do metiloma [a soma total das modificações de metilação no genoma]) em um maior número de tipos de câncer provavelmente irá contribuir de modo considerável para o conhecimento dessa área.

TABELA 55-11 Resumo de alguns aspectos importantes da apoptose

• A apoptose envolve uma série geneticamente programada de eventos e difere da necrose.
• Toda a série de reações é uma cascata, semelhante à coagulação sanguínea.
• Caracteriza-se por retração da célula, formação de bolhas na membrana, ausência de inflamação e padrão distinto (em escada) de degradação do DNA.
• Muitas caspases (proteinases) estão envolvidas; algumas são iniciadoras, enquanto outras são efetoras (executoras).
• Há uma via externa e outra via interna (mt).
• O FAS e outros receptores estão envolvidos na via dos receptores de morte celular (externa) da apoptose.
• O estresse celular e outros fatores ativam a via mt; a liberação do citocromo c do citoplasma constitui um importante evento dessa via.
• A apoptose é regulada por um equilíbrio entre inibidores (antiapoptóticos) e ativadores (pró-apoptóticos).
• As células neoplásicas adquiriram mutações que possibilitam a sua evasão da apoptose, prolongando, assim, a sua existência.

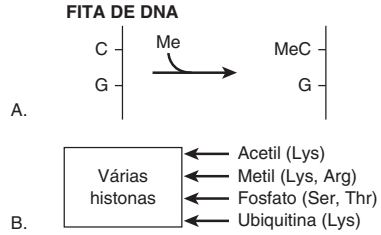


FIGURA 55-13 Alguns fatores envolvidos na epigenética. (**A**) Metilação da citosina para formar 5′-metilcitosina. A citosina geralmente está localizada próxima a um resíduo de guanina, formando uma ilha CpG. A metilação da citosina por uma metiltransferase está associada ao silenciamento das atividades de determinados genes. (**B**) Modificações pós-tradução de várias histonas. Resíduos específicos de histonas específicas são modificados por várias enzimas, alterando a conformação e as atividades das histonas modificadas. Por exemplo, a acetilação das lisinas N-terminais em algumas histonas está associada à abertura da cromatina e ao aumento na transcrição de determinados genes. (**C**) Remodelagem da cromatina: ver a Figura 36-10.

EXISTE MUITO INTERESSE NO PAPEL DAS CÉLULAS-TRONCO NO CÂNCER

As células-tronco foram discutidas de modo sucinto no Capítulo 52. Atualmente, muitos cientistas estão pesquisando o papel desempenhado pelas células-tronco no câncer. Acredita-se que as células-tronco no câncer abriguem mutações que, ou por elas próprias ou em associação com outras mutações, tornam essas células cancerosas. Podem ser detectadas pelo uso de marcadores de superfície específicos ou por outras técnicas. Há evidências que os **tecidos circundantes** (p. ex., componentes da matriz extracelular) podem influenciar significativamente o comportamento dessas células. Um importante conceito que estimula parte da pesquisa nesse campo é a crença de que uma das razões pelas quais a quimioterapia do câncer, com frequência, não é bem-sucedida reside na **existência de um reservatório de células-tronco cancerosas**, o qual não é sensível à quimioterapia convencional. As razões para que isso ocorra incluem o fato de que muitas células-tronco são relativamente dormentes, apresentam sistemas ativos de reparo do DNA, expressam transportadores de fármacos capazes de expelir os agentes antineoplásicos e, muitas vezes, são resistentes à apoptose.

Há evidências cumulativas de que as células-tronco cancerosas desempenham papéis efetivamente fundamentais em muitos tipos de neoplasia. Se assim for, o desenvolvimento de terapias com alta especificidade para destruição dessas células será de extremo valor.

OS TUMORES FREQUENTEMENTE ESTIMULAM A ANGIOGÊNESE

As células tumorais necessitam de um suprimento sanguíneo adequado para obter nutrientes para a sua sobrevida. Foi constatado que tanto as células tumorais quanto as células de tecidos adjacentes aos tumores **secretam fatores** que estimulam o crescimento de novos vasos sanguíneos (i.e., **angiogênese**). Há muito interesse na angiogênese tumoral, em parte porque, se for possível inibi-la especificamente, isso poderá fornecer um método seletivo de destruição das células tumorais.

O crescimento de vasos sanguíneos que irrigam as células tumorais pode ser estimulado por **hipoxia** e por outros fatores. A hipoxia causa níveis elevados do **fator induzível por hipoxia 1** (HIF-1) que, por sua vez, aumenta os níveis do **fator de crescimento do endotélio vascular** (VEGF), um importante fator estimulante da angiogênese. Foram identificados cerca de **cinco tipos de VEGF** (A a E), com maior interesse no VEGF A. Esses fatores interagem com receptores específicos de tirosina-quinase nas células endoteliais e células linfáticas. Esses receptores, por meio de vias de sinalização, causam *up-regulation* da via NF-κB (ver Capítulo 50), resultando em proliferação de células endoteliais e formação de novos vasos sanguíneos. Os vasos sanguíneos que suprem os tumores não são normais; com frequência, apresentam uma estrutura desorganizada e são muito mais permeáveis do que os vasos sanguíneos normais. Além dos VEGF, outras moléculas, como a angiopoietina, o fator de crescimento dos fibroblastos beta, o TGF-α e o fator de crescimento da placenta, também **estimulam a angiogênese**. Algumas outras moléculas também **inibem** o crescimento dos vasos sanguíneos (p. ex., angiogenina e endostatina).

Foram desenvolvidos **anticorpos monoclonais** contra o VEGF A (p. ex., bevacizumabe ou Avastatin), que têm sido utilizados no tratamento de alguns tipos de câncer (p. ex., câncer de colo e de mama). Esses anticorpos ligam-se ao VEGF e impedem a sua ação. Foi constatado que eles aumentam a sobrevida global do paciente, porém a maioria destes acaba sofrendo recidiva. Acredita-se que sejam mais bem usados em associação com outras terapias antineoplásicas. Anticorpos monoclonais dirigidos contra outros fatores de crescimento que estimulam a angiogênese também estão sendo desenvolvidos e utilizados terapeuticamente, assim como moléculas pequenas inibidoras da angiogênese. Os inibidores da angiogênese são úteis em **outras condições**, como a degeneração macular "úmida" relacionada com a idade e a retinopatia diabética, em que a proliferação de vasos sanguíneos constitui uma característica.

A METÁSTASE CONSTITUI O ASPECTO MAIS GRAVE DO CÂNCER

Foi estimado que cerca de **85% da mortalidade** associada ao câncer resultam de metástases. A disseminação do câncer geralmente ocorre via vasos linfáticos ou sanguíneos. A metástase é um processo complexo, e suas bases moleculares ainda não estão elucidadas.

A **Figura 55-14** fornece um esquema simplificado de metástase. O evento inicial consiste no **destacamento** de células tumorais do tumor primário. Em seguida, essas células podem ter acesso à circulação (ou aos vasos linfáticos), em um processo denominado **intravasamento**. Uma vez na circulação, essas células

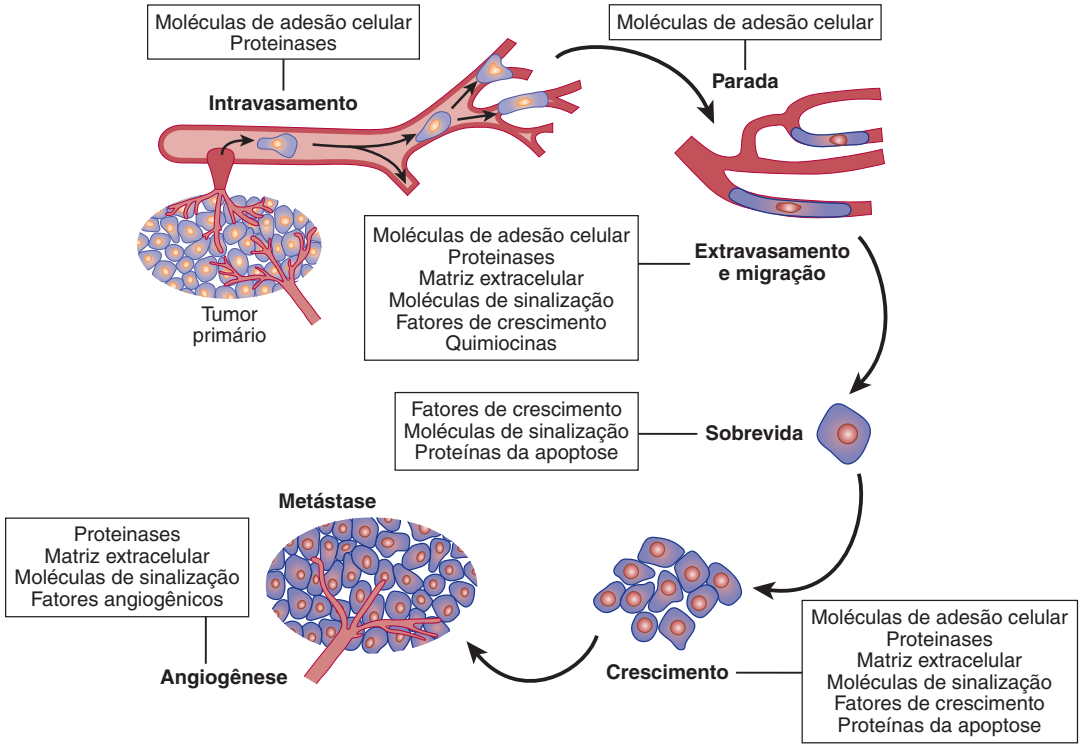


FIGURA 55-14 Esquema simplificado de metástase. Representação esquemática da sequência de etapas no processo de metástase, indicando alguns dos fatores supostamente envolvidos. De Tannock IF et al.: *The Basic Science of Oncology.* 4th ed. McGraw-Hill, 2005.

tendem a ficar **paradas** no leito capilar mais próximo. Nesse local, elas **extravasam** e **migram** pela MEC adjacente para alcançar um local de estabelecimento. Posteriormente, caso **sobrevivam** aos mecanismos de defesa do hospedeiro, elas **crescem** em velocidade variável. Para assegurar o seu crescimento, elas necessitam de um **suprimento sanguíneo adequado**, conforme discutido anteriormente. A seguir, alguns aspectos desses eventos são descritos de modo mais detalhado.

Muitos estudos **demonstraram a ocorrência de alterações de moléculas normais** na superfície das células neoplásicas. Essas alterações podem possibilitar uma **redução da adesão celular** e o destacamento de células neoplásicas do câncer original. As moléculas presentes nas superfícies celulares envolvidas na adesão celular são denominadas **moléculas de adesão celular** (CAM) (ver **Tabela 55-12**). A diminuição na quantidade de **caderina E**, uma molécula de grande importância na adesão de muitas células normais, pode ajudar a explicar a aderência reduzida de numerosas células neoplásicas. Muitos estudos mostraram a ocorrência de alterações das **cadeias oligossacarídicas das glicoproteínas de superfície celular**, em consequência da atividade alterada de várias glicosiltransferases (ver Capítulo 47). Uma alteração importante consiste no aumento da atividade da **GlcNAc transferase V**. Essa enzima catalisa a transferência da GlcNAc para uma cadeia oligossacarídica em crescimento, formando uma ligação $\beta 1 \rightarrow 6$ e possibilitando o crescimento adicional da cadeia. Foi proposto que essas cadeias alongadas participem de uma **rede de glicanos alterados** na superfície celular. Isso pode causar uma reorganização estrutural dos receptores e de outras moléculas, predispondo, talvez, à disseminação das células cancerosas.

Uma propriedade importante de muitas células neoplásicas é a sua capacidade de liberar várias **proteinases** na MEC. Das quatro classes principais de proteinases (serina, cisteína, aspartato e metaloproteinases), o foco de interesse particular no câncer tem sido as metaloproteinases (MP), que constituem uma família muito grande de enzimas dependentes de metais (normalmente zinco). Diversos estudos mostraram um aumento de atividade de **MP** nos tumores, como a MP-2 e a MP-9 (também conhecidas como gelatinases). Essas enzimas são capazes de degradar proteínas na membrana basal e na MEC, como colágenos e outras proteínas, facilitando a disseminação das células tumorais. Foram desenvolvidos inibidores dessas enzimas, porém até o momento, não obtiveram nenhum sucesso clínico.

A **transição epitélio-mesenquimal** constitui um fator que possibilita um aumento da mobilidade das células neoplásicas. Trata-se de uma mudança da morfologia e da função das células epiteliais para o tipo mesenquimal, talvez induzida por fatores de crescimento. O tipo mesenquimal caracteriza-se por uma maior quantidade de filamentos de actina, possibilitando um aumento de motilidade, que constitui uma propriedade essencial das células que metastatizam.

A **MEC** desempenha um importante papel nas metástases. Há evidências de uma **comunicação** por mecanismo de sinalização entre células neoplásicas e células da MEC. Os **tipos de células** existentes na MEC também podem afetar a ocorrência de metástase. Conforme assinalado anteriormente, as **proteinases** que degradam as proteínas na MEC podem facilitar a disseminação das células neoplásicas. Além disso, a MEC contém diversos **fatores de crescimento** passíveis de influenciar o comportamento dos tumores.

Em seus trajetos, as células tumorais ficam expostas a várias células do **sistema imune** (como as células T, as células NK e os macrófagos) e devem ser capazes de sobreviver à sua exposição. Algumas dessas células de vigilância secretam várias **quimiocinas**, que consistem em pequenas proteínas capazes de atrair diversas células, como os leucócitos, causando, algumas vezes, uma resposta inflamatória às células tumorais.

Foi estimado que apenas cerca de 1:10.000 células podem ter **capacidade genética** de efetuar uma colonização bem-sucedida. Algumas células tumorais exibem predileção por **metastatizar para órgãos específicos** (p. ex., células da próstata para o osso); moléculas específicas de superfície celular podem estar envolvidas nesse tropismo.

Diversos estudos demonstraram que **determinados genes potencializam a metástase**, enquanto outros atuam como **genes supressores da metástase**. Existem estudos em andamento para pesquisar como esses genes atuam exatamente, todavia, a sua existência levanta a possibilidade de que o aumento da expressão de um gene supressor de tumor por algum fármaco ou outro método poderia ter benefício terapêutico.

A **Tabela 55-13** fornece um resumo de alguns aspectos importantes relativos ao processo de metástase.

TABELA 55-12 Algumas moléculas de adesão celular (CAM) importantes

• Caderinas
• Superfamília das imunoglobulinas (Ig) (Ig CAM)
• Integrinas
• Selectinas

As CAM podem ser homofílicas ou heterofílicas. As CAM homofílicas interagem com moléculas idênticas nas células adjacentes, enquanto as CAM heterofílicas o fazem com moléculas diferentes. As caderinas são homofílicas, enquanto as selectinas e integrinas são heterofílicas, e as CAM Ig podem ser tanto homofílicas quanto heterofílicas. As integrinas são discutidas de modo sucinto no Capítulo 52, e as selectinas, no Capítulo 47.

TABELA 55-13 Alguns aspectos importantes relativos ao processo de metástase

• Com frequência, identifica-se a existência de uma transição celular epitélio-mesenquimal nos cânceres, possibilitando uma maior motilidade das células potencialmente metastáticas.
• O processo de metástase é relativamente ineficaz (apenas cerca de 1:10.000 células tumorais pode ter o potencial genético de colonização).
• As células metastáticas precisam evadir de várias células do sistema imune para sobreviver.
• Alterações nas moléculas de superfície celular (p. ex., CAM e outras) estão envolvidas.
• O aumento da atividade das proteinases (p. ex., da MP-2 e da MP-9) facilita a invasão.
• Foi demonstrada a existência de genes potencializadores e supressores da metástase.
• Algumas células neoplásicas metastatizam preferencialmente para órgãos específicos.
• Assinaturas de genes de metástase podem ser detectadas por microanálise dos genes; podem ter valor diagnóstico.

Abreviaturas: CAM, molécula de adesão celular; MP, metaloproteinase.

AS CÉLULAS NEOPLÁSICAS EXIBEM UMA ALTA TAXA DE GLICÓLISE AERÓBIA

Muitos aspectos do **metabolismo** das células neoplásicas (p. ex.: dos carboidratos, lipídeos, aminoácidos e ácidos nucleicos) foram e estão sendo estudados. Uma abordagem atual consiste na análise de amostras de sangue e de urina por **espectrometria de massa** à procura de alterações no perfil de metabólitos que possam **ajudar a detectar a presença de câncer em um estágio inicial**. Nesta seção, serão descritos apenas alguns dos estudos realizados sobre o metabolismo da glicose.

A **glicose** e o aminoácido **glutamina** constituem dois dos metabólitos mais abundantes no plasma e juntos são responsáveis por grande parte do metabolismo dos carbonos e do nitrogênio nas células humanas. Na década de 1920, o bioquímico alemão Otto Warburg e colaboradores fizeram uma importante descoberta sobre a bioquímica das células neoplásicas. Verificaram que elas captam grandes quantidades de **glicose** e a metabolizam a ácido lático, mesmo na presença de oxigênio (o denominado **efeito de Warburg**). As razões dessa **alta taxa de glicólise aeróbia** ainda estão em fase de pesquisa. Warburg postulou que essa elevada taxa poderia ser decorrente de um **defeito da cadeia respiratória**, de modo que as células tumorais compensam esse defeito pela produção de maiores quantidades de ATP pela glicólise. Pesquisas subsequentes forneceram várias outras explicações, incluindo o fato de que as células tumorais possuem uma **menor quantidade de mitocôndrias** do que as células normais e contêm uma **isoenzima da hexoquinase** (**HK-2**) ligada à mitocôndria, que não está sujeita a controle por retroalimentação, possibilitando uma captação aumentada de glicose. As pesquisas recentes concentraram-se no achado de que as células tumorais apresentam uma **isoenzima diferente da piruvato-quinase** (PK) (ver Capítulo 18). As células normais apresentam a PK-1, enquanto as células tumorais contêm PK-2; essas enzimas são produzidas por *splicing* alternativo do mesmo produto gênico. Por razões complexas que ainda não foram totalmente elucidadas, essa mudança de perfil de isoenzima está associada e resulta em **menor produção de ATP** (ver **Figura 55-15**). Além disso, acredita-se que essa alteração possibilite uma maior utilização dos metabólitos produzidos pela glicólise para o **desenvolvimento da biomassa** (proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos, etc) necessária para a proliferação das células neoplásicas. Isso fornece uma explicação para a suposta vantagem seletiva conferida para as células tumorais que apresentam uma elevada taxa de glicólise.

Apesar da angiogênese, muitos tumores sólidos têm áreas localizadas de suprimento sanguíneo deficiente e, portanto, altas taxas de glicólise anaeróbia. Isso leva a uma produção excessiva de ácido lático, com consequente acidose local. Foi postulado que a produção local de ácido pode facilitar a invasão das células tumorais. A baixa tensão de oxigênio em áreas de tumores com pouco suprimento sanguíneo estimula a formação do fator induzível por hipoxia 1 (HIF-1). Esse fator de crescimento, cuja atividade é estimulada pela presença de baixa tensão de oxigênio, causa *up-regulation* – entre outras ações – as atividades de pelo menos oito genes que controlam a síntese das enzimas glicolíticas.

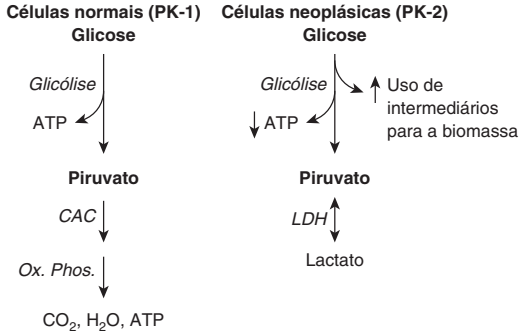


FIGURA 55-15 Isoenzimas da piruvato-quinase e glicólise nas células normais e neoplásicas. Nas células normais, a principal fonte de ATP é a fosforilação oxidativa. A glicólise fornece uma certa quantidade de ATP. A principal isoenzima da piruvato-quinase (PK) nas células normais é a PK-1. Nas células neoplásicas, a glicólise aeróbia é proeminente, ocorre produção de ácido lático pela ação da lactato desidrogenase (LDH), e a produção de ATP a partir da fosforilação oxidativa está diminuída (não ilustrada na figura). Nas células neoplásicas, a PK-2 constitui a principal isoenzima da PK. Por razões complexas que ainda não estão totalmente elucidadas, essa alteração no perfil de isoenzima das células neoplásicas está associada a uma diminuição da produção efetiva de ATP a partir da glicólise, porém, há um aumento na utilização de metabólitos para o desenvolvimento da biomassa. (CAC, ciclo do ácido cítrico; OX PHOS, fosforilação oxidativa.)

O **pH** e a **tensão de oxigênio** nos tumores constituem fatores importantes que afetam as ações dos fármacos antineoplásicos e de outros tratamentos. Por exemplo, a eficácia antineoplásica da radioterapia do câncer é significativamente menor em condições de hipoxia. Foram desenvolvidos compostos químicos para **inibir a glicólise** nas células tumorais e, talvez, matá-las seletivamente (ver **Tabela 55-14**). Embora tenha sido demonstrada uma eficiência variável nos estudos pré-clínicos, até o momento nenhum deles teve muita aplicação clínica. Esses compostos incluem o **3-bromopiruvato** (um inibidor da HK-2) e a **2-desoxi-D-glicose** (um inibidor da HK-1). Outro composto, o **dicloroacetato** (DCA), inibe a atividade da piruvato-desidrogenase quinase e, portanto, estimula a atividade da piruvato-desidrogenase (ver Capítulo 18), desviando o substrato da glicólise para o ciclo do ácido cítrico. Até o momento, nenhum desses compostos teve qualquer uso clínico significativo.

TABELA 55-14 Alguns compostos que inibem a glicólise e que demonstraram ter atividade antineoplásica variável

Composto	Enzima inibida
3-Bromopiruvato	Hexoquinase II
2-Desoxi-D-glicose	Hexoquinase I
Dicloroacetato	Piruvato-desidrogenase quinase
Iodoacetato	Gliceraldeído fosfato desidrogenase

A justificativa para o desenvolvimento desses agentes consiste no fato de que a glicólise está muito mais ativa nas células tumorais, de modo que a sua inibição pode causar maior lesão dessas células do que das células normais. A inibição da PDH quinase resulta em estimulação da PDH, desviando o piruvato da glicólise.
Abreviatura: PDH, piruvato-desidrogenase.

AS MITOCÔNDRIAS EXIBEM ALTERAÇÕES NAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS

As **mitocôndrias** estão envolvidas em diversos aspectos do câncer. Já foi mencionada a possibilidade de que uma **quantidade diminuída** de mitocôndrias esteja implicada no efeito de Warburg nas células neoplásicas. As mitocôndrias geram **espécies reativas de oxigênio** (ROS), que podem lesar o DNA, e também estão envolvidas na **apoptose** (ver anteriormente). Foram também detectadas mutações que afetam o **DNA mitocondrial** (**mt**) e, portanto, várias proteínas mt, embora o seu papel preciso na biologia das células neoplásicas ainda não tenha sido estabelecido. A possível participação da **hexoquinase-2** ligada às mitocôndrias no efeito de Warburg foi mencionada anteriormente. Outra enzima mitocondrial que foi alvo de considerável atenção recente é a **isocitrato desidrogenase** (IDH) (ver Capítulo 18). Foram detectadas mutações dessa enzima em gliomas e na leucemia mieloide aguda. Essas mutações provocam uma elevação do 2-hidroxiglutarato, que pode exercer efeitos sobre as células tumorais. A **Figura 55-16** fornece um resumo de alguns dos aspectos relativos às mitocôndrias.

OS BIOMARCADORES PODEM SER MEDIDOS EM AMOSTRAS DE SANGUE

A realização de testes bioquímicos (ver Capítulo 56) muitas vezes é útil no tratamento de pacientes com câncer (p. ex., alguns pacientes com cânceres avançados podem apresentar níveis plasmáticos elevados de cálcio, que podem causar graves problemas se não forem controlados). Muitos cânceres estão associados à produção anormal de enzimas, proteínas e hormônios, que podem ser determinados em amostras de plasma ou de soro. Essas moléculas são conhecidas como **biomarcadores tumorais**, e algumas delas estão relacionadas na **Tabela 55-15**.

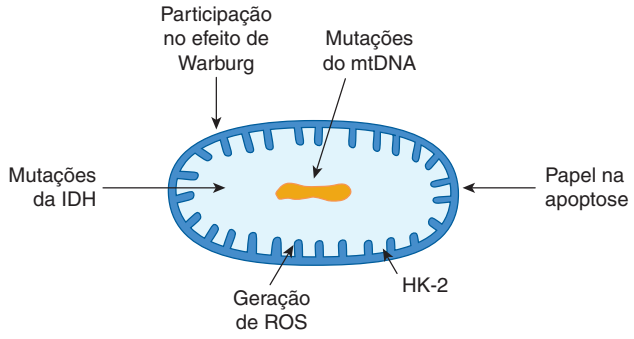


FIGURA 55-16 Algumas atuações das mitocôndrias no câncer. As mitocôndrias atuam de várias maneiras no câncer, porém nem todas estão indicadas nesta figura. As possíveis explicações para o efeito de Warburg são discutidas no texto. São encontradas mutações do mtDNA, embora o seu significado ainda não esteja totalmente esclarecido. As mitocôndrias desempenham um importante papel na apoptose, e um evento importante consiste na liberação do citocromo c no citoplasma. Muitas células neoplásicas apresentam uma isoenzima da hexoquinase (HK-2), que desempenha um papel na captação aumentada da glicose pelas células tumorais. São geradas espécies reativas de oxigênio (ROS) nas mitocôndrias, que podem ser importantes na produção de mutações. Estudos recentes demonstraram que determinadas células tumorais apresentam uma isoenzima anormal da isocitrato desidrogenase (IDH), cujo significado está sendo objeto de estudo.

Todavia, elevações significativas de alguns dos biomarcadores listados na Tabela 55-15 também ocorrem em uma variedade de **condições não neoplásicas**. Por exemplo, elevações do nível do **antígeno prostático específico** (PSA), uma glicoproteína sintetizada pelas células da próstata, ocorrem não apenas em pacientes com câncer de próstata, mas também naqueles com prostatite e hiperplasia prostática benigna (HPB). De forma semelhante, são detectadas elevações do **antígeno carcinoembrionário** (CEA) não apenas em pacientes com vários tipos de câncer, mas também em fumantes compulsivos e indivíduos com colite ulcerativa e cirrose. Como as elevações dos biomarcadores tumorais geralmente não são específicas de câncer, a determinação da maioria desses biomarcadores não é utilizada basicamente para o diagnóstico do câncer. Sua principal aplicação consiste em acompanhar a **eficiência dos tratamentos** e **detectar a ocorrência precoce de recidiva**. O uso do CEA no tratamento de um paciente com câncer colorretal é discutido de modo sucinto no Caso nº 4, no Capítulo 57. Assim como outros exames laboratoriais (Capítulo 56), é preciso considerar o **quadro clínico global** quando se interpretam os resultados das determinações dos biomarcadores tumorais.

Espera-se que a pesquisa contínua da **proteômica** forneça novos biomarcadores tumorais de **maior sensibilidade e especificidade**, bem como marcadores capazes de indicar a presença de **câncer em um estágio inicial** de seu desenvolvimento.

O uso de **microanálise** das células cancerosas revelou alguns biomarcadores úteis. Essa análise tem sido usada na subclassificação de tumores (p. ex., de mama) e tem fornecido informações úteis sobre o prognóstico e a previsão de resposta à terapia. Trata-se de uma área de análise laboratorial em rápida expansão.

TABELA 55-15 Alguns biomarcadores tumorais úteis medidos no sangue

Biomarcador tumoral	Câncer associado
Alfa-fetoproteína (AFP)	Carcinoma hepatocelular, tumor de células germinativas
Calcitonina (CT)	Tireoide (carcinoma medular)
Antígeno carcinoembrionário (CEA)	Colo, pulmão, mama, pâncreas, ovário
Gonadotropina coriônica humana (hCG)	Doença trofoblástica, tumor de células germinativas
Imunoglobulina monoclonal	Mieloma
Antígeno prostático específico (PSA)	Próstata

Observa-se também uma elevação da maioria desses biomarcadores tumorais no sangue de pacientes com doenças não neoplásicas. Por exemplo, o CEA está elevado em uma variedade de distúrbios gastrintestinais não neoplásicos, e ocorre elevação do PSA na prostatite e na hiperplasia prostática benigna. Esta é a razão pela qual a interpretação dos resultados elevados dos biomarcadores tumorais precisa ser feita com cautela e também o motivo pelo qual a sua principal aplicação consiste em acompanhar a eficiência dos tratamentos e a ocorrência de recidiva. Existem também vários outros biomarcadores tumorais amplamente usados.

O CONHECIMENTO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA CARCINOGÊNESE LEVOU AO DESENVOLVIMENTO DE NOVAS TERAPIAS

Uma das grandes esperanças na pesquisa do câncer é que a elucidação dos mecanismos fundamentais envolvidos nessa doença possa **levar a novas terapias mais bem-sucedidas**. Isso já ocorreu em certo grau, e espera-se que os avanços contínuos acelerem esse processo.

Os **agentes quimioterápicos clássicos** incluem os agentes alquilantes, os complexos da platina, os antimetabólitos, os venenos do fuso e outros fármacos. Esses agentes não são discutidos aqui.

Entre as classes de fármacos desenvolvidos mais recentemente destacam-se os **inibidores da transdução de sinais** (incluindo inibidores da tirosina-quinase), os **anticorpos monoclonais** dirigidos contra várias moléculas-alvo, os **inibidores dos receptores de hormônios**, **fármacos que afetam a diferenciação**, **agentes antiangiogênese** e **modificadores da resposta biológica**. A **Tabela 55-16** fornece exemplos de cada um desses fármacos. A seguir, serão feitos alguns comentários a respeito de alguns deles.

O achado acerca de defeitos disseminados nos mecanismos de sinalização em células neoplásicas e, em particular, a detecção de mutações nas **tirosina-quinases** levaram ao desenvolvimento de inibidores dessas enzimas. O sucesso mais notável foi, provavelmente, a introdução do imatinibe no tratamento da leucemia mielocítica crônica (LMC). O imatinibe é um fármaco administrado por via oral, que inibe a tirosina-quinase formada devido à translocação cromossômica *ABL-BCR* envolvida na gênese da LMC. Esse fármaco já produziu remissões completas em muitos pacientes, e pode ser associado a outros fármacos. Foram também desenvolvidos **outros inibidores da tirosina-quinase**. Dois deles são o Erlotinibe e o Gefinibe, que **inibem o receptor do fator de crescimento epidérmico** (**EGFR**). Essa molécula está excessivamente expressa em determinados tipos de câncer de pulmão (p. ex., câncer de células não pequenas) e de mama, resultando em sinalização aberrante. É importante perceber que o desenvolvimento desses fármacos antineoplásicos, assim como de outros, exige **um conhecimento estrutural detalhado** (obtido por cristalografia por raios X, estudos de RM, construção de modelos, etc.) das moléculas-alvo. Outra classe de fármacos que demonstraram ser úteis são os **anticorpos monoclonais** dirigidos contra várias moléculas presentes na superfície das células neoplásicas. Alguns desses anticorpos monoclonais estão listados na Tabela 55-16.

Outras abordagens em relação ao tratamento do câncer que estão sendo desenvolvidas ou utilizadas, mas que não estão relacionadas na Tabela 55-16, incluem vários tipos de **terapia gênica** (incluindo siRNA, Capítulo 34), **imunoterapia** (ver adiante), **vírus oncolíticos** (vírus que invadem preferencialmente as células tumorais e as matam), **inibidores do receptor de progesterona, inibidores da aromatase** (ver Capítulo 41) (para alguns tipos de câncer de mama e de ovário), **inibidores da telomerase**, aplicação de **nanotecnologia** (p. ex., nanoenvoltórios e outras nanopartículas), **fototerapia** (ver Capítulo 31) e fármacos **seletivamente direcionados para células-tronco cancerosas**.

É importante reconhecer que todos os fármacos antineoplásicos possuem **efeitos colaterais**, alguns dos quais são severos, e que pode haver desenvolvimento de **resistência** a muitos deles depois de um período de tempo variável. A bioquímica do **mecanismo de desenvolvimento de resistência das células neoplásicas a fármacos** constitui uma importante área de pesquisa que não será considerada aqui. O objetivo global no desenvolvimento de fármacos para a terapia do câncer consiste em usar as novas informações obtidas de estudos básicos da biologia do câncer para o desenvolvimento de agentes mais seguros e mais efetivos. A compreensão das **diferenças genéticas** no processamento dos fármacos (ver Capítulo 53) também pode ajudar a **personalizar os tratamentos com fármacos antineoplásicos**.

A **Figura 55-17** fornece um resumo de alguns dos **alvos** da terapia farmacológica e de algumas **terapias** emergentes que foram desenvolvidas a partir de estudos relativamente recentes dos aspectos básicos do câncer.

EXISTEM MUITOS ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DO CÂNCER

A imunologia dos tumores é um grande campo de estudo. Apenas alguns comentários serão feitos nesta seção. É provável que o declínio da responsividade imunológica que acompanha o **envelhecimento** possa desempenhar um papel na incidência au-

TABELA 55-16 Alguns agentes antineoplásicos que se baseiam nos recentes avanços sobre o conhecimento da biologia do câncer

Classe	Exemplo	Usados no tratamento de
Inibidores da transdução de sinais	Imatinibe, um inibidor da tirosina-quinase	LMC
Anticorpos monoclonais	Trastuzumabe, um Mab dirigido contra o receptor HER2/Neu	Estágio avançado do câncer de mama
Agentes antiangiogênese	Bevacizumabe, um Mab dirigido contra o VEGF A	Câncer de colo e de mama
Agentes anti-hormonais	Tamoxifeno, um antagonista do receptor de estrogênio	Câncer de mama
Agentes que afetam a diferenciação	Ácido todo-*trans*-retinoico, direcionado para o receptor de ácido retinoico nas células da leucemia promielocítica, que causam a sua diferenciação	Leucemia promielocítica
Agentes que afetam alterações epigenéticas	5′-Azadesoxicitidina, inibe as DNA metiltransferases SAHA inibe as histona-desacetilases	Algumas leucemias Linfoma de células T cutâneo

Em alguns casos, os agentes listados podem ter sido substituídos por outros agentes mais efetivos. Além disso, alguns dos agentes listados são usados no tratamento de outras condições.

Abreviaturas: LMC, leucemia mielocítica crônica; Mab, anticorpo monoclonal; SAHA, ácido suberoilanilida hidroxâmico (Vorinostat); VEGF A, fator de crescimento do endotélio vascular A.

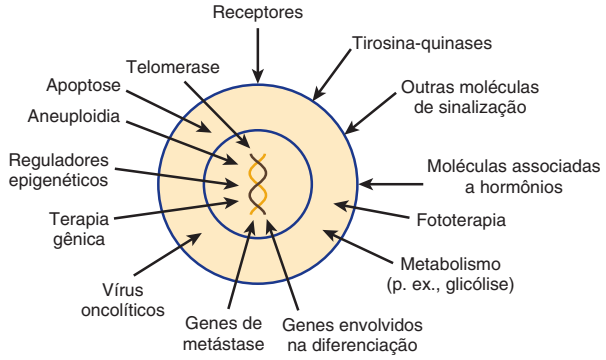


FIGURA 55-17 Alguns alvos dos fármacos antineoplásicos e algumas terapias emergentes, ambos desenvolvidos a partir de pesquisas relativamente recentes. A figura não mostra os agentes antiangiogênicos, as aplicações da nanotecnologia, as terapias dirigidas contra as células-tronco cancerosas e as abordagens imunológicas. Os alvos e as terapias assinalados são, em sua maior parte, discutidos sucintamente no texto.

mentada de câncer no idoso. Uma esperança de longa data é que as abordagens imunológicas, em virtude de sua **especificidade,** possam ser capazes de matar seletivamente as células neoplásicas. Existem muitos estudos clínicos em andamento que estão investigando essa possibilidade. Nesses estudos clínicos, são usados vários **anticorpos**, **vacinas** e **diversos tipos de células T**, que geralmente podem ser manipulados de uma maneira ou de outra para aumentar a sua capacidade de destruir as células neoplásicas.

A **inflamação crônica** envolve aspectos da função imune. Há evidências de que ela pode **predispor ao câncer** (p. ex., a incidência de câncer colorretal é muito maior do que o normal em indivíduos que tiveram colite ulcerativa de longa duração). Algumas células inflamatórias produzem quantidades relativamente grandes de **espécies reativas de oxigênio**, que podem causar lesão do DNA e, talvez, contribuir para a oncogênese. Foi também relatado que o **ácido acetilsalicílico em baixas doses** pode diminuir o risco de desenvolvimento de câncer colorretal, talvez em virtude de sua ação anti-inflamatória.

RESUMO

- O câncer é causado por mutações de genes que controlam a multiplicação das células, a morte celular (apoptose) e as interações intercelulares (p. ex., adesão celular). Outros aspectos importantes do câncer consistem em defeitos disseminados nas vias de sinalização celular, estimulação da angiogênese e aneuploidia.
- A grande maioria dos cânceres resulta de mutações que acometem as células somáticas. Entretanto, foram identificadas muitas condições hereditárias de câncer.
- As principais classes de genes envolvidos no câncer incluem os oncogenes e os genes supressores de tumor. As mutações que afetam genes que dirigem a síntese e a expressão dos microRNA também são importantes.
- As alterações epigenéticas estão sendo progressivamente reconhecidas no câncer (e em outras doenças); um dos motivos que levaram a seu interesse é que elas podem ser reversíveis.
- A biologia das metástases está sendo intensivamente investigada; a descoberta de genes potencializadores e supressores, entre outros achados, pode levar ao desenvolvimento de novas terapias.
- O processo da apoptose foi descrito de modo sucinto. As células neoplásicas adquirem mutações que possibilitam a sua evasão da apoptose, prolongando, assim, a sua existência.
- O sequenciamento total do genoma dos cânceres está ajudando a revelar as mutações importantes que ocorrem em muitos tipos de câncer e está fornecendo novas informações sobre a evolução das células neoplásicas.
- As células neoplásicas exibem várias alterações no seu metabolismo. Um importante achado que atraiu muita atenção é a elevada taxa de glicólise aeróbia exibida por muitas células. Foram descritas as possíveis explicações para esse fenômeno. As mitocôndrias apresentam algumas alterações em muitas células neoplásicas.
- De modo global, o desenvolvimento do câncer é um processo em múltiplas etapas, que envolve alterações genéticas que conferem uma vantagem seletiva dos clones de células, dos quais alguns acabam adquirindo a capacidade de metastatizar com sucesso. Em virtude da diversidade das mutações, é possível que não existam dois tumores com genomas idênticos.
- Os marcadores tumorais podem ajudar no estabelecimento precoce do diagnóstico de câncer. Esses marcadores são particularmente usados para acompanhar a resposta do câncer ao tratamento e para detectar a ocorrência de recidivas.
- Os avanços na compreensão da biologia molecular das células neoplásicas levaram à introdução de muitas terapias novas, enquanto outras estão em fase de desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

Berger M, Lawrence, MS, Demechelis F, et al: The genomic complexity of primary human prostate cancer. Nature 2011; 470(7333):214.

Bielas JH, Loeb KR, Rubin BP, et al: Human cancers express a mutator phenotype. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103(48):18238.

Couzin-Frankel J: Immune therapy steps up the attack. Science 2010;330:440.

Croce CM: Oncogenes and cancer. N Engl J Med 2008;358(5):502. (One of a series of 12 articles on the molecular origins of cancer published in this journal between Jan 31, 2008 and Dec 17, 2009).

Dick JE: Stem cell concepts renew cancer research. Blood 2008;112:4793.

Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, et al (editors): *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17th ed. McGraw-Hill, 2008. (A number of Chapters cover various aspects of cancer, but Chapters 77–81 and 103–106 are particularly relevant to this Chapter).

Green DR: *Means to an End: Apoptosis and Other Cell Death Mechanisms*. Cold Spring Harbor Press, 2010.

Kaiser J: Epigenetic drugs take on cancer. Science 2010;330:576. (Also see other articles on Epigenetics in the same issue of Science),

Lodish H, Berk A, Kaiser CA, et al: *Molecular Cell Biology*. 6th ed. WH Freeman & Co, 2008. (Contains a comprehensive chapter on cancer).

Mukerjee S: *The Emperor of All Maladies: A Biography of Cancer*. Scribner, 2010.

Nussbaum RL, McInnes, RR, Willard HF: *Thompson and Thompson Genetics in Medicine*. 7th ed. Saunders Elsevier, 2007.

Tannock IF, Hill RP, Bristow RG, Harrington L (editors): *The Basic Science of Oncology*. 4th ed. McGraw-Hill, 2005.

Thompson SL, Bakhoum SF, Compton DA: Mechanisms of chromosomal instability. Curr Biol 2010; 20(6): R285.
Weinberg R: *The Biology of Cancer,* Garland Science. 2006.
Yachida S, Jones S, Bozic I, et al: Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. Nature 2010 (Oct 28);467(7319):1114.
Journals dedicated to cancer research include the British Journal of Cancer, Cancer Research, Journal of the National Cancer Institute and Nature Reviews Cancer.

Websites úteis:

American Cancer Society. http://www.cancer.org
National Cancer Institute, U.S. National Institute of Health. http://www.cancer.gov
The Cancer Genome Atlas. http://cancergenome.nih.gov

GLOSSÁRIO

Aneuploidia: refere-se a qualquer condição na qual o número de cromossomo de uma célula não é um múltiplo exato do número haploide básico. A aneuploidia, que é encontrada em muitas células tumorais, pode desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento do câncer.

Angiogênese: formação de novos vasos sanguíneos. A angiogênese geralmente está ativa ao redor das células tumorais, assegurando o fornecimento de um suprimento sanguíneo adequado. Diversos fatores de crescimento são secretados pelas células tumorais e adjacentes (p. ex., fator de crescimento do endotélio vascular, VEGF) e estão envolvidos nesse processo.

Apoptose: morte celular em decorrência da ativação de um programa genético que provoca fragmentação do DNA celular e outras alterações. As caspases desempenham um papel central no processo. A apoptose é afetada por numerosos reguladores positivos e negativos. A proteína p53 induz a apoptose como resposta à lesão do DNA. As células neoplásicas, exibem, em sua maioria, anormalidades no processo de apoptose, em decorrência de várias mutações que ajudam a garantir a sua sobrevida prolongada.

Câncer: crescimento maligno de células.

Carcinógeno: qualquer agente (p. ex., um composto químico ou radiação) capaz de transformar células em células neoplásicas.

Carcinoma: crescimento maligno de origem epitelial. Um câncer de origem glandular ou que exibe características glandulares é geralmente designado como adenocarcinoma.

Caspases: enzimas proteolíticas que desempenham um papel central na apoptose, mas que também estão envolvidas em outros processos. Foram identificadas cerca de 15 caspases nos seres humanos. Essas enzimas hidrolisam as ligações peptídicas imediatamente C-terminais aos resíduos de aspartato.

Célula-tronco cancerosa: uma célula dentro de um tumor que tem a capacidade de autorrenovação e de dar origem às linhagens heterogêneas de células neoplásicas encontradas no tumor.

Células malignas: células neoplásicas – células que têm a capacidade de crescer de modo desenfreado, invadir e propagar-se (metastatizar) para outras partes do corpo.

Centríolo: conjunto de microtúbulos em pares encontrado no centro de um centrossomo. (Ver também **Centrossomo**)

Centrômero: região de constrição de um cromossomo mitótico onde as cromátides estão unidas. Está em estreita proximidade ao cinetócoro. A ocorrência de anormalidades nos centrômeros pode contribuir para a instabilidade cromossômica CI. (Ver também **Cinetócoro**)

Centrossomo: organela de localização central que constitui o principal centro de organização dos microtúbulos de uma célula. Atua como polo do fuso durante a divisão celular.

Ciclo celular: os vários eventos que ocorrem durante a divisão celular, à medida que uma célula passa de uma mitose para outra.

Cinetócoro: estrutura que se forma em cada cromossomo mitótico em posição adjacente ao centrômero. As mutações que afetam as estruturas de suas proteínas constituintes podem contribuir para a CI. (Ver também **Centrômero**.)

Clone: todas as células de um clone derivam de uma célula-mãe.

Complexo cromossômico de passageiros: complexo de proteínas que desempenham um papel essencial na regulação da mitose. No centrômero, o complexo direciona o alinhamento dos cromossomos e participa na organização do fuso. Suas proteínas incluem a aurora B cinase e a survivina. As mutações que afetam as proteínas desse complexo podem contribuir para a CI e aneuploidia.

Cromátide: um único cromossomo.

Cromossomo Filadélfia: cromossomo formado por uma translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22. Constitui a causa da leucemia mieloide crônica (LMC). Para formar o cromossomo anormal, parte do gene *BCR* (região de agrupamento de pontos de quebra) do cromossomo 22 funde-se com parte do gene *ABL* (que codifica uma tirosinocinase) do cromossomo 9, dirigindo a síntese de proteína quimérica que apresenta atividade desregulada de tirosina-quinase e que estimula a proliferação celular. A atividade dessa quinase é inibida pelo fármaco Imatinibe (Gleevec), que tem sido usado com sucesso no tratamento da LMC. (Ver também **Translocação cromossômica**.)

Deslizamento na replicação: um processo em que, devido ao alinhamento incorreto das fitas de DNA onde ocorrem sequências repetidas, a DNA-polimerase para e dissocia-se, resultando em deleções ou inserções de sequências repetidas.

Epigenética: refere-se a alterações da expressão dos genes, sem qualquer alteração da sequência de bases do DNA. Os fatores que provocam alterações epigenéticas incluem metilação de bases do DNA, modificações pós-tradução de histonas e remodelagem da cromatina.

Fatores de crescimento: diversos peptídeos secretados por muitas células normais e tumorais. Essas moléculas atuam de modo autócrino (afetam as células que produzem o fator de crescimento), parácrino (afetam as células adjacentes) ou endócrino (circulam no sangue para afetar células distantes). Os fatores de crescimento estimulam a proliferação de células-alvo por meio de interações com receptores específicos. Eles também apresentam muitas outras propriedades biológicas.

Fatores induzíveis por hipoxia: uma família de fatores de transcrição (pelo menos três) importantes na determinação das respostas celulares a níveis variáveis de oxigênio. Cada fator é constituído de uma subunidade α diferente regulada por oxigênio e de uma subunidade β constitutiva comum. Na presença de níveis fisiológicos de oxigênio, a subunidade α sofre rápida degradação, sendo o processo iniciado por prolil-hidroxilases. Os HIF desempenham várias funções; por exemplo, o HIF-1 suprarregula vários genes que codificam enzimas da glicólise, bem como a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

Gene supressor de tumor: um gene cujo produto proteico normalmente reprime o crescimento celular; entretanto, quando a sua atividade é perdida ou reduzida por mutações, contribui para o desenvolvimento de uma célula.

Instabilidade cromossômica (CI): a taxa de ganho ou de perda de cromossomos inteiros ou de segmentos em decorrência de anormalidades de sua segregação durante a mitose. (Ver também **Instabilidade do genoma** e **Instabilidade de microssatélites**.) Existem vários distúrbios designados como síndromes de CI devido à sua associação a anormalidades cromossômicas. Uma delas é a síndrome de Bloom, na qual se observa uma elevada frequência de trocas de cromátides-irmãs. Nessas condições, observa-se uma alta incidência de vários tipos de câncer.

Instabilidade de microssatélites: expansão ou contração de repetições em *tandem* curtas (microssatélites), devido ao deslizamento da replicação, anormalidades no reparo de pareamento desigual ou de recombinação homóloga. Para **Microssatélites**, ver o Capítulo 35.

Instabilidade do genoma: refere-se a diversas alterações do genoma, entre as quais as duas principais consistem em CI e instabilidade de microssatélites. Em geral, reflete o fato de que os genomas das células neoplásicas

são mais suscetíveis a mutações do que as células normais, devido, em parte, ao comprometimento do sistema de reparo do DNA.

Leucemias: variedade de doenças malignas, em que diferentes leucócitos (p. ex., mieloblastos, linfoblastos, etc) proliferam de maneira desenfreada. As leucemias podem ser agudas ou crônicas.

Linfoma de Burkitt: trata-se de um linfoma de células B endêmico em certas regiões da África, onde ele acomete principalmente a mandíbula e os ossos da face. É também encontrado em outras áreas. Caracteriza-se por uma translocação recíproca envolvendo o gene C-*MYC* no cromossomo 8 e o gene da cadeia pesada das imunoglobulinas no cromossomo 14.

Linfoma: grupo de neoplasias que surgem nos sistemas reticuloendotelial e linfático. Os principais membros do grupo são o linfoma de Hodgkin e os linfomas não Hodgkin.

Metástase: capacidade das células neoplásicas de se propagar em partes distantes do corpo, onde crescem.

Microanálise do DNA: análise que utiliza um disco, geralmente de silício, na qual foram aplicados milhares de ácidos nucleicos diferentes. Amostras de cDNA ou DNA genômico são aplicadas, permitindo a ocorrência de hibridização (ligação entre sequências complementares). As interações podem ser quantificadas para avaliar a expressão dos genes ou outros parâmetros. Existem várias microanálises comerciais ("*chips* de genes"). Essa técnica está sendo muito usada em pacientes com câncer para ajudar na classificação dos tumores, bem como na previsão do prognóstico e da resposta à terapia farmacológica.

Modificadores da resposta biológica: moléculas produzidas pelo corpo ou no laboratório que, quando administradas a pacientes, alteram a resposta do corpo à infecção, à inflamação e a outros processos. Os exemplos incluem: anticorpos monoclonais, citocinas, interleucinas, interferons e fatores de crescimento.

Mutação causal (condutora): mutação de um gene que ajuda a causar câncer ou a acelerá-lo. As mutações encontradas em tumores que não provocam câncer nem a sua progressão são denominadas mutações passageiras.

Nanotecnologia: o desenvolvimento e a aplicação de dispositivos cujo tamanho é de apenas alguns nanômetros (10^{-9} m = 1 nm). Alguns desses dispositivos estão sendo aplicados na terapia do câncer. Por exemplo, as **nanopartículas** (partículas esféricas muito pequenas com centro de sílica e revestimento de ouro), ajustada para a luz próxima ao infravermelho foram administradas a camundongos com tumores, nos quais essas partículas se acumulam. Subsequentemente, os tumores foram submetidos a uma luz de *laser* quase infravermelha. Isso aqueceu seletivamente os tumores, destruindo-os, e não houve nenhum sinal de recidiva durante o acompanhamento. (Morton JG et al.: Nanoshells for photothermal cancer therapy. Methods Mol Biol 2010;624:101. June 25, 2010.)

Necrose: morte celular induzida por compostos químicos ou lesão tecidual. Várias enzimas hidrolíticas são liberadas e digerem as moléculas celulares. Não se trata de um programa geneticamente programado, como no caso da apoptose. As células afetadas sofrem ruptura e liberam seu conteúdo, causando inflamação local.

Neoplasia: qualquer crescimento novo de tecido, seja ele benigno ou maligno.

Oncogene: um proto-oncogene que sofreu mutação, cujo produto proteico está envolvido na transformação de uma célula normal em célula neoplásica.

Oncologia: área da ciência médica que trata de todos os aspectos do câncer (causas, diagnóstico, tratamento, etc.).

Perda da heterozigosidade (LOH): ocorre quando há perda do alelo normal (que frequentemente codifica um gene supressor de tumor) de um par de cromossomos heterozigotos, possibilitando a manifestação clínica das consequências do alelo defeituoso.

Pólipo adenomatoso: tumor benigno de origem epitelial, com potencial de se transformar em carcinoma. Com frequência, os adenomas são polipoides. Um pólipo é um crescimento que faz protrusão de uma membrana mucosa; a maioria é de natureza benigna, porém alguns podem tornar-se malignos.

Procarcinógeno: composto químico que se transforma em carcinógeno quando alterado pelo metabolismo.

Proto-oncogene: gene celular normal que, quando sofre mutação, pode dar origem à um produto que estimula o crescimento das células, contribuindo para o desenvolvimento do câncer.

Receptor FAS: receptor que inicia a apoptose quando se liga a seu ligante, FAS. A FAS é uma proteína encontrada na superfície das células *natural killer* ativadas, linfócitos T citotóxicos e outras fontes.

Remodelagem da cromatina: envolve mudanças na conformação dos nucleossomos produzidas pelas ações de complexos multiproteicos (como o complexo SW1/SNF). Essas mudanças alteram a transcrição dos genes (estimulação ou repressão, dependendo das condições específicas). Os complexos contêm domínios homólogos à helicase dependente de ATP; esses complexos estão envolvidos nas mudanças de conformação. As mutações que afetam as proteínas dos complexos, como as que podem ocorrer em células neoplásicas, podem afetar a expressão dos genes. (Ver também **Epigenética**.)

Retinoblastoma: tumor raro da retina. A mutação do gene supressor de tumor *RB* desempenha um papel essencial no seu desenvolvimento. Os pacientes com retinoblastoma hereditário herdam uma cópia do gene RB que sofreu mutação e necessitam apenas de uma mutação adicional para desenvolver o tumor. Pacientes com retinoblastoma esporádico nascem com duas cópias normais e devem sofrer duas mutações para inativar o gene.

Sarcoma: tumor maligno de origem mesenquimal (p. ex., de células da matriz extracelular ou de outras fontes).

Síndrome de Bloom: uma das síndromes de CI. Causada por mutações de uma DNA-helicase. Os indivíduos acometidos são sensíveis à lesão do DNA e podem desenvolver vários tumores.

Telômeros: estruturas nas extremidades do cromossomo que contêm múltiplas repetições de sequências específicas de DNA de hexanucleotídeos. Os telômeros das células normais encurtam-se com as divisões celulares repetidas, podendo levar à morte da célula. A enzima telomerase atua na replicação dos telômeros e, com frequência, está expressa nas células neoplásicas, ajudando-as a escapar da morte celular. Geralmente, a telomerase não é detectada nas células somáticas normais.

Teste de Ames: sistema de ensaio planejado pelo Dr. Bruce Ames que utiliza cepas especiais de *Salmonella typhimurium* para detectar mutágenos. Os carcinógenos são, em sua maioria, mutágenos, porém se a mutagenicidade de determinado composto químico for detectada, a conduta ideal consiste em avaliar a sua carcinogenicidade com testes em animais.

Transformação: o processo pelo qual células normais em cultura tecidual transformam-se em células anormais (p. ex., por vírus oncogênicos ou por compostos químicos), algumas das quais podem ser malignas.

Translocação cromossômica: ocorre quando parte de um cromossomo se funde com outro, causando a ativação de um gene nesse local. O cromossomo Filadélfia (ver adiante) é um dos muitos exemplos de translocação cromossômica envolvida na etiologia do câncer.

Translocação: deslocamento de parte de um cromossomo para outro cromossomo ou para uma parte diferente do mesmo cromossomo. Os exemplos clássicos incluem a translocação encontrada no linfoma de Burkitt (ver anteriormente) e a translocação entre os cromossomos 9 e 22, que produz o cromossomo Filadélfia encontrado na leucemia mielógena crônica. Foram identificadas translocações em muitas células neoplásicas.

Tumor: qualquer crescimento novo de tecido, porém frequentemente refere-se a uma neoplasia benigna ou maligna.

Variações no número de cópias (VNC): variações (devido a duplicações ou a deleções) entre indivíduos no número de cópias de determinados genes. As VNC estão sendo mais reconhecidas para diversos genes, e algumas podem estar associadas a várias doenças, incluindo determinados tipos de câncer.

Vírus do sarcoma de Rous (RSV): vírus tumoral de RNA que provoca sarcomas em galinhas. Foi descoberto em 1911 por Peyton Rous. Trata-se de um retrovírus que utiliza a transcriptase reversa em sua replicação; a cópia de DNA de seu genoma integra-se subsequentemente no genoma da célula hospedeira. Foi amplamente usado em estudos de câncer, resultando em muitos achados importantes.

CAPÍTULO

56

Bioquímica Clínica

Joe Varghese, M.B. B.S., M.D., Molly Jacob, M.B. B.S., M.D., Ph.D., e Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever de modo sucinto a importância dos testes bioquímicos em medicina clínica.
- Discutir as principais considerações para as quais é preciso estar atento quando se solicitam exames laboratoriais e se interpretam os resultados.
- Citar e ter uma compreensão geral dos principais exames usados na avaliação das funções hepática, renal, tireoidiana e suprarrenal.

IMPORTÂNCIA DOS EXAMES LABORATORIAIS EM MEDICINA CLÍNICA

Os exames laboratoriais (lab) desempenham um importante papel, ajudando médicos e outros profissionais de saúde a estabelecer diagnósticos e outras avaliações clínicas. Neste capítulo, são discutidos apenas os exames bioquímicos (mas não hematológicos, microbiológicos, imunológicos ou outros tipos), com poucas exceções. Além disso, o capítulo apresenta apenas uma breve visão geral do assunto; os estudantes de medicina irão receber uma cobertura muito mais abrangente durante os anos de estudos acadêmicos de medicina.

Os exames laboratoriais constituem apenas parte do processo diagnóstico em medicina clínica. De fato, afirma-se que um médico experiente pode chegar a um diagnóstico relativamente acurado em cerca de 80% dos casos, baseando-se apenas em uma anamnese e exame físico minuciosos; entretanto, alguns podem duvidar da validade dessa declaração. Contudo, hoje, não há dúvida de que os exames bioquímicos e outros exames laboratoriais quase sempre representam uma importante parte do processo global de diagnóstico. Todavia, o uso de pesquisa bioquímica e exames laboratoriais não se restringe ao diagnóstico de doenças. A **Tabela 56-1** fornece um resumo de algumas das diferentes aplicações dos exames bioquímicos, juntamente com exemplos.

Antes de solicitar qualquer investigação laboratorial é preciso responder a duas questões importantes: "Que informações úteis poderei obter ao solicitar este exame? e "Ele irá ajudar o paciente?" Os conceitos discutidos neste capítulo irão contribuir para responder a essas questões e ajudar a saber utilizar os exames laboratoriais no manejo de pacientes.

TABELA 56-1 Principais usos dos exames bioquímicos, com exemplos selecionados

Usos	Exemplos selecionados
Confirmar o diagnóstico de doenças específicas	Uso dos níveis plasmáticos de troponina cardíaca I (cTI) no diagnóstico precoce de infarto do miocárdio.
Sugerir um tratamento racional da doença	A obtenção de um nível elevado de colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) fornece uma indicação para tratamento com fármacos que reduzem o colesterol (como as estatinas) em indivíduos com risco de doença cardiovascular.
Usados como testes de triagem no diagnóstico precoce de determinadas doenças	Os níveis de hormônio de estimulação da tireoide (TSH) em recém-nascidos ajuda no diagnóstico de hipotireoidismo congênito.
Ajudam a monitorar o progresso de determinadas doenças	A atividade da alanina transaminase (ALT) no soro é usada para monitorar a evolução da hepatite viral.
Ajudam a avaliar a resposta de doenças ao tratamento	Em pacientes com hipo ou hipertireoidismo, a determinação dos níveis de TSH ajuda a monitorar a resposta do paciente ao tratamento.
Revelam as causas e os mecanismos fundamentais de doenças	Demonstrar a natureza do defeito genético na fibrose cística.

CAUSAS DE ANORMALIDADES NOS NÍVEIS DOS ANALITOS MEDIDOS NO LABORATÓRIO

Inúmeras condições e distúrbios podem causar anormalidades nos níveis de várias moléculas (analitos) medidos nos laboratórios clínicos. Alguns estão listados na **Tabela 56-2**.

Com base nesse quadro, é evidente que as condições que causam níveis anormais de analitos são diversas. Por exemplo, quando ocorre lesão tecidual, as membranas celulares são danificadas, e há um aumento na permeabilidade da membrana plasmática das células afetadas. Em consequência, ocorre **extravasamento de moléculas intracelulares no sangue** (p. ex., extravasamento de troponinas no sangue após infarto do miocárdio), com consequente aumento dos níveis sanguíneos. Em outros casos, **a síntese de determinadas moléculas está aumentada ou diminuída** (p. ex., proteína C-reativa [PCR] nos estados inflamatórios ou hormônios específicos em certos distúrbios endócrinos). A insuficiência renal e a insuficiência hepática levam ao acúmulo de diversas moléculas (p. ex., creatinina e amônia, respectivamente) no sangue, devido a **uma incapacidade do órgão em questão de excretar ou metabolizar o analito** específico.

VALIDADE DOS RESULTADOS LABORATORIAIS

Os laboratórios diagnósticos de qualidade são regularmente submetidos à inspeção e a procedimentos regulamentares. O objetivo é avaliar a validade de seus resultados e assegurar o **controle de qualidade** de seus relatórios. Tais medidas irão assegurar que o valor da concentração, atividade ou quantidade de determinada substância em uma amostra fornecida por um laboratório clínico represente o melhor valor passível de ser obtido com o método, os reagentes e os instrumentos usados e técnicos envolvidos na obtenção e no processamento da amostra. Além disso, é importante que os médicos tenham um conhecimento básico acerca da validade dos resultados laboratoriais e sua interpretação. Também é uma boa prática visitar os laboratórios e discutir com os funcionários apropriados certas questões e problemas que possam surgir relacionados aos valores dos resultados laboratoriais.

A **exatidão** refere-se ao grau de proximidade entre o valor estimado de um analito e o valor "verdadeiro" do analito na amostra. A **precisão** denota a reprodutibilidade de uma análise e refere-se à capacidade do método empregado de produzir repetidamente o mesmo valor quando se mede repetidamente um analito em determinada amostra. A precisão é expressa como a variação observada quando essas medições repetidas do analito são efetuadas. A precisão não é absoluta, porém está sujeita à variação inerente na complexidade do método usado, na estabilidade dos reagentes, na exatidão do padrão primário usado, na sofisticação do equipamento utilizado para o ensaio e na habilidade do técnico do laboratório. Cada laboratório deve manter dados de precisão (reprodutibilidade) que possam ser expressos estatisticamente em termos de desvio-padrão (DP) do valor médio obtido por repetidas análises da mesma amostra.

Por exemplo, a precisão na determinação do nível sérico de colesterol em um bom laboratório pode ser o valor médio de

TABELA 56-2 Causas comuns de anormalidades em analitos medidos em laboratórios clínicos

Condição	Exemplos selecionados
Certas condições fisiológicas	Níveis elevados de hCG durante a gravidez, níveis sanguíneos elevados de lactato após exercício físico vigoroso.
Alterações no volume dos líquidos orgânicos	A hipernatremia (níveis séricos elevados de sódio) pode acompanhar a desidratação, devido à sudorese ou a vômitos excessivos.
Alterações no equilíbrio do pH	Os níveis séricos de bicarbonato estão baixos na acidose metabólica (p. ex., cetoacidose diabética) e elevados na alcalose metabólica (p. ex., vômitos intensos).
Alterações da função endócrina	Os níveis séricos de TSH estão baixos no hipertireoidismo primário e elevados no hipotireoidismo primário.
Alterações no estado nutricional	A albumina sérica está baixa na desnutrição energética proteica (DEP).
Lesão ou morte celular	Os níveis séricos de creatina-quinase MB (CK-MB) e de troponinas cardíacas específicas estão elevados após a ocorrência de lesão cardíaca. A amilase pancreática sérica está elevada na pancreatite aguda.
Processos inflamatórios agudos ou crônicos (incluindo infecções)	A proteína C-reativa (PCR) está elevada nas condições inflamatórias.
Doenças genéticas	Os níveis plasmáticos de fenilalanina estão elevados na fenilcetonúria.
Falência orgânica	Os níveis séricos de creatinina e de urato estão elevados na insuficiência renal.
Traumatismo	Os níveis séricos de mioglobina podem estar elevados após lesão/traumatismo muscular.
Câncer	Vários marcadores tumorais estão elevados em tipos específicos de câncer, como a alfa fetoproteína no carcinoma hepatocelular.
Fármacos	A quimioterapia para o câncer aumenta os níveis séricos de ácido úrico.
Venenos	Os venenos organofosforados diminuem a atividade da butirilcolinesterase no sangue.
Outros	O estresse pode aumentar os níveis séricos de cortisol e de catecolaminas.

determinações repetidas, com DP de 5 mg/dL. Os intervalos de confiança de 95% para esse ensaio são de ±2 DP ou ± 10 mg/dL. Isso significa que qualquer valor fornecido é "exato" dentro de uma faixa de 20 mg/dL. Por conseguinte, um valor relatado de 200 mg/dL significa que, em 95% dos casos, o valor verdadeiro situa-se entre 190 e 210 mg/dL. De modo semelhante, para determinação dos níveis séricos de potássio em uma amostra, um DP de ± 0,1 mmol/L indica que o intervalo de confiança de 95% de ± 2 DP para esse ensaio é de ± 0,2 mmol/L. Assim, um valor de potássio de 5,5 mmol/L indica que, em 95% dos casos, o verdadeiro valor situa-se na faixa de 5,3 a 5,7 mmol/L. Podem ser obtidos valores entre 5,3 e 5,7 mmol/L em análises repetidas da amostra, que estarão, portanto, dentro dos limites de precisão do teste.

AVALIAÇÃO DA VALIDADE DE UM EXAME LABORATORIAL

O valor clínico de um exame laboratorial depende de sua **especificidade**, de sua **sensibilidade** e da **prevalência** da doença na população testada.

A **sensibilidade** refere-se à **porcentagem de resultados positivos em pacientes com a doença**. Preferencialmente, um exame deve ter uma sensibilidade de 100%. Entretanto, este nível raramente é alcançado. Por exemplo, o teste do antígeno carcinoembrionário (CEA) apresenta uma sensibilidade abaixo do ideal; apenas 72% dos indivíduos com carcinoma de colo apresentam resultados positivos quando a doença é extensa, e apenas 20% quando a doença está em seu estágio inicial. Com frequência, os exames laboratoriais apresentam uma menor sensibilidade nos estágios iniciais de muitas doenças, em contraste com a sua maior sensibilidade na doença bem estabelecida. Na análise bioquímica, a sensibilidade refere-se à capacidade do método de detectar pequenas alterações nos níveis do analito. A concentração mínima do analito capaz de ser detectada de modo confiável é denominada **limite de detecção**. Em geral, um teste altamente sensível apresenta um limite muito baixo de detecção.

A **especificidade** refere-se à **porcentagem de resultados negativos entre indivíduos que não apresentam a doença**. Preferencialmente, os exames devem ter uma especificidade de 100%. O teste do CEA para o carcinoma de colo tem uma especificidade variável; cerca de 3% dos indivíduos não fumantes apresentam um resultado falso-positivo (especificidade de 97%), enquanto 20% dos fumantes apresentam resultados falso-positivos (especificidade de 80%). Na análise bioquímica, a especificidade também pode indicar se outras substâncias ou fatores além do analito medido influenciam de algum modo o ensaio (**interferência** positiva ou negativa).

O **valor preditivo de um teste positivo** (valor preditivo positivo) define a porcentagem de resultados positivos que são verdadeiros positivos. De modo semelhante, o **valor preditivo de um teste negativo** (valor preditivo negativo) define a porcentagem de resultados negativos que são verdadeiros negativos. Esse valor está relacionado com a **prevalência da doença**. Por exemplo, em um grupo de pacientes em uma enfermaria de urologia, a prevalência de doença renal é maior do que na população geral. Nesse grupo, os níveis séricos de creatinina terão maior valor preditivo do que na população geral. As fórmulas para o cálculo da sensibilidade, da especificidade e dos valores preditivos de um teste para diagnóstico são apresentadas na **Tabela 56-3**.

Um teste **ideal** para diagnóstico é aquele que apresenta uma sensibilidade de 100% e especificidade de 100%. Entretanto, isso não ocorre na maioria dos testes atualmente disponíveis, se não em todos eles. Antes de solicitar um exame, é importante procurar determinar se a sensibilidade, a especificidade e o valor preditivo do teste são adequados para fornecer informações úteis. O resultado obtido deve **influenciar o diagnóstico**, **o prognóstico ou o tratamento**, ou deve levar a uma **melhor compreensão do processo mórbido** e **beneficiar o paciente**.

VARIÁVEIS QUE AFETAM OS VALORES DA ANÁLISE

Além da idade e do sexo, muitos **outros fatores** (**denominados variáveis pré-analíticas**) podem afetar os valores dos analitos e

TABELA 56-3 Tabela comparativa ilustrando os conceitos de sensibilidade, especificidade e valores preditivos

		O paciente apresenta alguma doença?	
		Sim	**Não**
Qual o resultado do teste?	**Positivo**	Verdadeiro positivo(a)	Falso-positivo (b)
	Negativo	Falso-negativo (c)	Verdadeiro negativo (d)
Sensibilidade	$= \frac{\text{Verdadeiro positivo (a)} \times 100}{\text{Número de pacientes que apresentam a doença (a + c)}}$		
Especificidade	$= \frac{\text{Verdadeiro negativo (d)} \times 100}{\text{Número de pacientes que não apresentam a doença (b + d)}}$		
Valor preditivo positivo	$= \frac{\text{Verdadeiro positivo (a)} \times 100}{\text{Número de pacientes que apresentam um teste positivo (a + b)}}$		
Valor preditivo negativo	$= \frac{\text{Verdadeiro negativo (d)} \times 100}{\text{Número de pacientes que apresentam um teste negativo (c + d)}}$		

influenciar a sua faixa de referência. Essas variáveis incluem **raça**, **ambiente, postura** (**em decúbito *versus* sentado**), **variações diurnas** ou outras **variações cíclicas**, **gravidez**, **jejum** ou **estado pós-prandial**, **alimentos ingeridos**, **fármacos** e **nível de exercício físico**. Por exemplo, é importante obter uma amostra de sangue para análise dos triglicerídeos depois de um jejum de 12 h. É também sempre importante perguntar ao paciente se está sendo medicado.

Os valores dos analitos também podem ser influenciados pelo **método de coleta da amostra**. Uma coleta inacurada de urina durante um período de 24 h, a ocorrência de hemólise de uma amostra de sangue, a adição de um anticoagulante inapropriado e a contaminação da vidraria ou outros aparelhos são outros exemplos de erros pré-analíticos passíveis de ocorrer.

Os erros também podem estar associados à análise das amostras. Os **erros aleatórios** são erros que não são facilmente identificados e que estão comumente associados a ensaios manuais. A automatização da análise pode reduzir significativamente os erros aleatórios. Por outro lado, os **erros sistemáticos** são erros inerentemente associados ao método de análise e levam a resultados não exatos. Com frequência, esses erros são identificados e corrigidos se os procedimentos de controle de qualidade forem adequadamente seguidos.

INTERPRETAÇÃO DOS EXAMES LABORATORIAIS

Os **valores normais** são geralmente considerados como aqueles que se situam dentro de dois desvios padrão (DP) (± 2 DP) do valor médio para uma população saudável. Essa faixa de valores constitui o **valor de referência**, que é construído a partir dos resultados de um analito obtidos de determinada população (p. ex., de homens adultos saudáveis, de 20 a 50 anos de idade). Outros valores de referência são construídos e usados para o mesmo analito para outras populações saudáveis, como mulheres adultas, recém-nascidos, lactentes, adolescentes e idosos. Essas faixas abrangem geralmente 95% da população selecionada. Os **valores normais ou de referência** variam de acordo com o método empregado, o instrumento analítico usado e as condições de coleta e preservação das amostras. As faixas normais estabelecidas por cada laboratório devem ser claramente expressas para assegurar uma interpretação correta dos resultados dos exames laboratoriais.

A interpretação dos resultados laboratoriais sempre deve ser relacionada com a **condição do paciente**. A obtenção de um baixo valor pode resultar de um déficit ou da diluição da substância medida (p. ex., baixo nível sérico de sódio). O desvio do valor normal pode estar associado a uma doença específica ou a alguma substância consumida pelo indivíduo. Por exemplo, podem ocorrer níveis elevados de ácido úrico em pacientes com gota ou devido ao tratamento com certos diuréticos ou com agentes antineoplásicos.

É importante enfatizar o **papel de um médico** na avaliação da probabilidade de doença nos indivíduos testados. É necessário ter uma razoável certeza acerca da presença ou da ausência de uma doença antes de avaliar um marcador substituto da doença. Isso irá assegurar uma interpretação ótima dos resultados do teste. Sempre que for obtido um **resultado incomum ou inesperado**, pode-se consultar um bioquímico clínico antes de iniciar qualquer tratamento baseado nesse resultado, a fim de assegurar que não tenha ocorrido nenhum erro pré-analítico. Se não for detectado nenhum erro desse tipo, o teste deve ser repetido para excluir um erro analítico.

A REALIDADE DOS EXAMES LABORATORIAIS – PERSPECTIVA PARA O SEU USO

É preciso ter sempre em mente que os **exames laboratoriais atuam como marcadores substitutos de patologia tecidual**. Eles não fornecem evidências definitivas dessa patologia e, portanto, não devem ser utilizados como único meio de estabelecer um diagnóstico em determinado paciente. As informações obtidas dos exames laboratoriais precisam ser combinadas com uma história clínica e dados de outras pesquisas para chegar a uma decisão diagnóstica. Os resultados de muitos exames complementares usados na prática clínica são muitas vezes expressos como positivos ou negativos. Isso é conveniente do ponto de vista matemático e clínico; entretanto, essas categorizações dicotômicas podem não representar a realidade clínica, pois os estados de doença frequentemente situam-se dentro de um espectro, de modo que essas demarcações rígidas podem levar a erros no diagnóstico.

AUTOMATIZAÇÃO DOS EXAMES LABORATORIAIS

A maioria dos laboratórios clínicos modernos utiliza um alto grau de **automatização**. Os analisadores automatizados melhoram a eficiência e reduzem os erros aleatórios que invariavelmente estão associados aos métodos manuais. A fase pré-analítica dos exames laboratoriais (p. ex., processamento e transporte das amostras) também pode ser automatizada, reduzindo, assim, o intervalo de tempo entre a coleta da amostra e sua análise.

TESTES DE FUNÇÃO ORGÂNICA

Os exames que fornecem informações sobre o funcionamento de determinados órgãos são geralmente reunidos sob a designação de testes de função orgânica e, algumas vezes, são solicitados em conjunto pelo médico. A seguir, os testes de função orgânica comumente efetuadas são discutidas de modo sucinto.

Testes de função hepática (PFH)

Os testes de função hepática (PFH) são um grupo de testes que ajudam no estabelecimento do diagnóstico, na monitoração do tratamento e na avaliação do prognóstico de doenças hepáticas. Os principais exames nessa categoria estão listados na **Tabela 56-4**. Cada exame avalia um aspecto específico da função hepática. Ocorrem elevações dos níveis de **bilirrubina sérica** devido a muitas causas, resultando em icterícia. Baixos níveis de **proteína sérica total** e **albumina** são observados em distúrbios hepáticos crônicos, como a cirrose. O **tempo de protrombina** (TP) pode estar prolongado em distúrbios hepáticos agudos, devido ao comprometimento na síntese dos fatores da coagulação.

TABELA 56-4 Testes de função hepática importantes

Teste	Aspecto da função hepática avaliada	Principal utilidade
1. Níveis séricos de bilirrubina (total e conjugada)	Indicador da capacidade do fígado de conjugar e excretar a bilirrubina (conjugação e função excretora).	Ajuda no diagnóstico diferencial da icterícia (ver Tabela 31-3).
2. Proteína sérica total e albumina	Medição da função de biossíntese do fígado, já que o fígado constitui o principal local de síntese da maioria das proteínas plasmáticas.	Indicador de gravidade de doença hepática crônica.
3. Tempo de protrombina	Medição da função de biossíntese do fígado, visto que vários fatores da coagulação são sintetizados no fígado.	Indicador de gravidade de doença hepática aguda.
4. Enzimas séricas:		
a. Aspartato transaminase (AST)	Atua como marcador de lesão dos hepatócitos que contêm AST em quantidades abundantes.	As atividades da AST e da ALT séricas constituem indicadores precoces de lesão hepática. São também úteis na monitoração da resposta ao tratamento.
b. Alanina transaminase (ALT)	Atua como marcador de lesão dos hepatócitos que contêm ALT em quantidades abundantes.	
c. Fosfatase alcalina (ALP)	Atua como marcador de obstrução biliar.	Ajuda no diagnóstico de obstrução do trato biliar.
5. Amônia sanguínea	Indicador da capacidade do fígado de desintoxicar a amônia.	Os níveis estão elevados na cirrose hepática com hipertensão porta e em distúrbios do ciclo da ureia.

As atividades da **alanina aminotransferase** (ALT) e **aspartato aminotransferase** (AST) séricas estão significativamente elevadas vários dias antes do aparecimento de icterícia na hepatite viral aguda. A ALT é considerada mais específica do que a AST para o fígado, pois esta última também pode estar elevada em casos de lesão do músculo cardíaco ou esquelético, o que não ocorre com a ALT. A atividade da **fosfatase alcalina** (ALP) **sérica** está elevada na icterícia obstrutiva. Pode-se observar também uma alta atividade da ALP sérica em doenças ósseas.

O fígado também constitui o principal local de destoxificação da amônia (no ciclo da ureia). A elevação dos níveis de **amônia no sangue** constitui um importante sinal de insuficiência hepática e desempenha um importante papel na patogenia da encefalopatia hepática em pacientes com cirrose hepática e hipertensão porta. Os níveis sanguíneos de amônia também estão elevados em distúrbios do ciclo da ureia.

A **razão albumina:globulina** (razão A:G) muitas vezes fornece informações clínicas úteis. A razão normal varia de 1,2:1 a 1,6:1. Pode-se observar uma inversão da razão A:G em condições nas quais os níveis de albumina estão baixos (hipoalbuminemia) ou quando as globulinas estão anormalmente altas, como, por exemplo, no mieloma múltiplo. A inversão da razão A:G frequentemente constitui a primeira investigação que levanta a suspeita de mieloma múltiplo.

Testes de função renal

Os principais testes de função renal estão listados na **Tabela 56-5**. Um **exame de urina** (**urinálise**) fornece informações valiosas sobre a função renal. Inclui uma avaliação das características físicas e químicas da urina. As características físicas incluem **volume** (isso requer uma amostra de urina programada, geralmente de 24 h), **odor**, **cor**, **aparência** (límpida ou turva), **densidade** e **pH**. **A proteína**, **a glicose**, **o sangue**, **os corpos cetônicos**, **os sais biliares** e **os pigmentos biliares** são constituintes anormais da urina que aparecem em diferentes doenças (**Tabela 56-6**). Atualmente, esses parâmetros podem, em sua maioria, ser estimados de modo semiquantitativo à cabeceira do paciente com o uso de **tiras reagentes descartáveis**. As tiras reagentes são fitas de plástico nas quais são impregnadas substâncias químicas específicas. Quando a porção da tira reagente que contém as substâncias químicas é mergulhada em uma amostra de urina, elas reagem com constituintes específicos da urina, produzin-

TABELA 56-5 Principais testes de função renal

1. Exame de urina **a.** Características físicas – avaliação do volume, cor, odor, aparência, densidade e pH. **b.** Características químicas – verificar a presença de proteína, açúcares redutores, corpos cetônicos, sangue, sais biliares e pigmentos biliares. **c.** Microscopia – investigar a presença de leucócitos, hemácias e cilindros.
2. Marcadores séricos da função renal **a.** Creatinina sérica **b.** Ureia sérica (ou ureia sanguínea [BUN])
3. Estimativa da taxa de filtração glomerular (TFG) **a.** Depuração da creatinina **b.** Depuração da inulina
4. Testes de função tubular renal **a.** Teste de privação de água **b.** Teste de acidificação da urina

TABELA 56-6 Alguns constituintes anormais da urina

Constituinte	Significado clínico	Exemplos de condições nas quais estão presentes
Proteína	A **proteinúria glomerular** refere-se à presença de albumina na urina, devido a uma ruptura na integridade da membrana basal glomerular.	Síndrome nefrótica, glomerulonefrite aguda, nefropatia diabética, etc.
	A **proteinúria por transbordamento** é causada pela presença de níveis anormalmente elevados de proteínas de baixo peso molecular no plasma, que são filtradas pelo glomérulo, aparecendo consequentemente na urina.	Mieloma múltiplo (as cadeias leves de imunoglobulinas aparecem na urina, resultando em proteinúria de Bence-Jones)
	A **proteinúria tubular** refere-se à presença de proteínas de baixo peso molecular (como a β_2-microglobulina) na urina, devido ao comprometimento da reabsorção dessas proteínas pelo túbulo proximal.	Síndrome de Fanconi, nefrotoxicidade devido a antibióticos aminoglicosídicos, metais pesados, etc.
	A **proteinúria pós-renal** refere-se à presença de proteínas na urina provenientes do trato urinário.	Infecção do trato urinário (ITU) resultando em exsudatos inflamatórios na urina
Glicose	**Glicosúria hiperglicêmica:** a presença de glicose na urina é geralmente observada quando o nível plasmático de glicose aumenta acima do limiar renal de ~180 mg/dL.	Diabetes melito não controlado
	Glicosúria renal: presença de glicose na urina, devido ao comprometimento da reabsorção de glicose no túbulo proximal.	Síndrome de Fanconi e defeitos hereditários no transportador de sódio-glicose 2 (SGLT2)
Corpos cetônicos	São observados níveis detectáveis na urina (cetonúria) em condições caracterizadas por aumento da cetogênese.	Cetoacidose diabética e cetoacidose de jejum prolongado
Sangue	A **hematúria** refere-se à presença de hemácias na urina, devido à ocorrência de sangramento no trato urinário.	Cálculos renais ou infecções do trato urinário
	A **hemoglobinúria** refere-se à presença de hemoglobina na urina, que ocorre devido à hemólise intravascular.	Transfusão de sangue incompatível, malária, etc.
Sais biliares e pigmentos biliares	A sua presença na urina está associada a uma obstrução do trato biliar.	Cálculo biliar ou carcinoma da cabeça do pâncreas causando obstrução do ducto colédoco

do uma mudança de cor que é proporcional à concentração da substância na amostra de urina.

A ureia e a creatinina no soro constituem marcadores da função renal (ver Tabela 56-5). Ambas as substâncias são excretadas principalmente na urina. Portanto, a deterioração da função renal está associada a aumentos dos níveis séricos dessas substâncias. A **creatinina** é considerada um melhor marcador de função renal do que a **ureia**, pois seu nível no sangue não é significativamente afetado por fatores não renais, tornando-a, assim, um indicador específico da função renal. Diversos fatores "pré-renais" (ingestão de proteína na alimentação, perfusão renal, etc.) e fatores "pós-renais" aumentam significativamente os níveis sanguíneos de ureia.

Em condições normais, a **quantidade total de proteína** excretada na urina em 24 h é inferior a 150 mg (albumina inferior a 30 mg) e não é detectável por exames de rotina. A presença de proteína em excesso na urina é designada como **proteinúria**. A proteinúria constitui um importante sinal de doença renal. A causa mais comum de proteinúria consiste em perda da integridade da membrana basal glomerular (proteinúria glomerular), conforme observado na síndrome nefrótica e na nefropatia diabética. Conforme listado na Tabela 56-6, ocorrem também outras causas de proteinúria (por transbordamento, tubular e pós-renal). A principal proteína encontrada na proteinúria glomerular é a **albumina**, que constitui a característica essencial deste distúrbio. A **microalbuminúria** é definida como a presença de 30 a 300 mg de albumina em uma amostra de urina de 24 h. É considerada como preditor precoce e independente de lesão renal e mortalidade cardiovascular no diabetes melito.

Embora a **creatinina sérica** seja considerada um marcador específico de função renal, a ocorrência de um aumento significativo de seu nível sanguíneo só é observada depois de um declínio de cerca de 50% na taxa de filtração glomerular

TABELA 56-7 Características de uma substância ideal para uso nos testes de depuração

1. Deve apresentar um nível sanguíneo razoavelmente constante.
2. Deve ser excretada do corpo apenas na urina.
3. Deve ser livremente filtrada no glomérulo.
4. Não deve ser reabsorvida nem secretada pelos túbulos renais.[1]

[1]A creatinina preenche todos esses critérios, exceto pelo fato de ser secretada em grau pequeno, porém variável, pelos túbulos renais. Por conseguinte, a depuração da creatinina superestima a TFG. Essa superestimação torna-se particularmente significativa quando a TFG é calculada nos estágios avançados da insuficiência renal crônica, quando se espera que a TFG esteja muito baixa.

TABELA 56-8 Principais provas de função datiroide

1. Níveis séricos de hormônio tireoestimulante (TSH)
2. Níveis séricos de tiroxina livre (T_4) e tri-iodotironina (T_3)
3. Os testes para doenças autoimunes da tireoide incluem testes para anticorpos antirreceptor de TSH, antitireoglobulina, antimicrossômico e antitireoperoxidase

(TFG). Por isso, trata-se de um teste de baixa sensibilidade. Por outro lado, a determinação da **depuração da creatinina**, que fornece uma estimativa da TFG, ajuda na detecção precoce de insuficiência renal. A **depuração** refere-se ao volume de plasma totalmente depurado de determinada substância pelo rim por unidade de tempo (geralmente um minuto). É calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Depuração (mL/min)} = \frac{U \times V}{P}$$

onde U = concentração do analito medido em uma amostra programa de urina (geralmente 24 h), P = concentração plasmática do analito e V = volume de urina por minuto (calculado dividindo-se o valor do volume de urina coletada em 24 h por 1.440 [24 × 60]).

A **depuração de inulina** é considerada como o método padrão clássico de medida da TFG, visto que preenche todos os critérios essenciais a uma substância usada em testes de depuração (**Tabela 56-7**). Entretanto, a **depuração da creatinina** é amplamente usada, devido à **facilidade de determinação da creatinina** (pelo método de Jaffe) e ao fato de ser uma **substância endógena** (diferentemente da inulina, que é de origem exógena e que precisa ser infundida por via intravenosa em uma velocidade constante).

Uma importante **desvantagem** associada ao uso dos testes de depuração na estimativa da TFG consiste na necessidade de uma amostra de urina acuradamente programada. Entretanto, esse problema pode ser superado pelo uso de uma fórmula, que pode ser usada para calcular um valor estimado da TFG (TFGE) a partir dos valores da creatinina sérica com correção para a idade, o sexo e o peso corporal. Essa fórmula é a denominada **fórmula de Cockcroft-Gault**, apresentada a seguir:

$$\frac{(140 - \text{idade}) \times \text{peso(kg)} \times 0{,}85 \text{ (para mulheres)}}{72 \times \text{creatinina sérica (mg/dL)}}$$

TABELA 56-9 Diagnóstico laboratorial dos distúrbios da tireoide

		Nível de TSH	
		Alto	**Baixo**
Nível de tiroxina livre	**Alto**	Hipertireoidismo secundário[1]	Hipertireoidismo primário
	Baixo	Hipotireoidismo primário	Hipotireoidismo secundário[1]

[1]Os hiper e o hipotireoidismo secundários são muito mais raros do que o hiper e hipotireoidismo primários.

TABELA 56-10 Testes de função suprarrenal comumente usados

Níveis hormonais em condições basais: • Níveis séricos de colesterol (8 horas da manhã e meia-noite) • Níveis urinários de cortisol (em uma amostra de urina de 24 h) • Níveis séricos de ACTH (8 horas da manhã)
Testes de supressão (para confirmar a presença de hiperfunção suprarrenal): • Teste de supressão com dexametasona
Testes de estimulação (para confirmar a presença de hipofunção suparrenal): • Teste de estimulação com synacthen (ACTH sintético)

Testes de função da tireoide

A glândula tireoide secreta os hormônios tireoidianos – a tiroxina ou tetraiodotironina (T_4) e a triiodotironina (T_3). É comum a ocorrência de condições clínicas associadas a um aumento ou a uma diminuição na síntese dos hormônios tireoidianos (hipertireoidismo e hipotireoidismo, respectivamente). Um diagnóstico clínico de distúrbio da tireoide é confirmado com o auxílio das provas de função desta. As principais provas de função da tireoide comumente efetuadas na prática clínica estão listadas na **Tabela 56-8**.

A determinação do **hormônio tireoestimulante** (**TSH**) constitui, com frequência, o primeiro teste realizado na avaliação da função da tiroide (ver também Caso 11, Capítulo 57). A concentração sérica de TSH apresenta-se elevada no hipotireoidismo primário e baixo ou indetectável no hipertireoidismo primário. A determinação dos níveis de tiroxina livre ajuda a estabelecer o diagnóstico na maioria dos casos em que são obtidos valores anormais do TSH **(Tabela 56-9)**. Essa estratégia demonstrou ter uma relação custo-benefício favorável e é clinicamente eficiente no diagnóstico dos distúrbios da tireoide.

Atualmente, os níveis séricos de **tiroxina total** raramente são determinados, já que se dispõe, no comércio, de ensaios confiáveis para medir a **tiroxina livre**. Os níveis de tiroxina total são afetados por alterações nos níveis da globulina de ligação de hormônios tireoidianos (TBG), na ausência de doença da tireoide. Outros testes, como a pesquisa de **autoanticorpos antitireoide,** podem ser efetuados para estabelecer o diagnóstico de doenças específicas relacionadas com a tireoide. Por exemplo, a doença de Graves está comumente associada à presença de **anticorpos antirreceptor de TSH**, enquanto a tireoidite autoimune (tireoidite de Hashimoto) está associada à presença de **anticorpos antitireoide peroxidase** (**antimicrossômicos**).

Testes de função suprarrenal

Um diagnóstico clínico de hiperfunção suprarrenal (síndrome de Cushing) ou de hipofunção (doença de Addison) é confirmado por testes de função suprarrenal. Os testes que costumam ser usados para esse propósito estão listados na **Tabela 56-10**.

A secreção de **cortisol** pela glândula suprarrenal exibe uma variação diurna regular. Os níveis séricos de cortisol estão mais elevados nas primeiras horas da manhã e declinam para um va-

TABELA 56-11 Valores de referência para testes laboratoriais bioquímicos selecionados[1]

Analito no sangue	Unidades SI[2]	Unidades internacionais
1. Hiato aniônico	7 a 16 mmol/L	7 a 16 meq/L
2. Gasometria arterial (GSA)		
a. pH	7,35 a 7,45	7,35 a 7,45
b. Bicarbonato	22 a 30 mmol/L	22 a 30 meq/L
c. pCO_2	4,3 a 6,0 kPa	32 a 45 mmHg
d. pO_2	9,6 a 13,8 kPa	72 a 104 mmHg
3. Eletrólitos e outros íons		
a. Sódio	136 a 146 mmol/L	136 a 146 meq/L
b. Potássio	3,5 a 5,0 mmol/L	3,5 a 5,0 meq/L
c. Cloreto	102 a 109 mmol/L	102 a 109 meq/L
d. Cálcio (total)	2,2 a 2,6 mmol/L	8,7 a 10,2 mg/100 mL
e. Fósforo (inorgânico)	0,81 a 1,4 mmol/L	2,5 a 4,3 mg/100 mL
f. Magnésio	0,62 a 0,95 mmol/L	1,5 a 2,3 mg/100 mL
4. Glicose		
a. Jejum		
i. Normal	4,2 a 6,1 mmol/L	75 a 110 mg/100 mL
ii. Comprometimento da tolerância à glicose	6,2 a 6,9 mmol/L	111 a 125 mg/dL
iii. Diabetes melito	> 7,0 mmol/L	> 125 mg/dL
b. Pós-prandial de 2 h	3,9 a 6,7 mmol/L	70 a 120 mg/100 mL
5. Hemoglobina glicada (HbA_{1C})	0,04 a 0,06 da fração da Hb	4,0 a 6,0%
6. Parâmetros de homeostasia do ferro		
a. Ferritina		
i. Homem	29 a 248 μg/L	29 a 248 ng/mL
ii. Mulher	10 a 150 μg/L	10 a 150 ng/mL
b. Ferro	7 a 25 μmol/L	41 a 141 μg/dL
c. Capacidade de ligação do ferro	45 a 73 μmol/L	251 a 406 μg/dL
d. Saturação da transferrina	0,16 a 0,35	16 a 35%
e. Transferrina	2,0 a 4,0 g/L	200 a 400 mg/dL
7. Testes de função renal:		
a. Creatinina		
i. Homem	53 a 106 μmol/L	0,6 a 1,2 mg/dL
ii. Mulher	44 a 80 μmol/L	0,5 a 0,9 mg/dL
b. Ureia	5,4 a 14,3 mmol/L	15 a 40 mg/100 mL
c. Ureia sanguínea (BUN)	2,5 a 7,1 mmol/L	7 a 20 mg/100 mL
d. Depuração da creatinina	1,5 a 2,2 mL/s	91 a 130 mL/min
8. Perfil lipídico:		
a. Colesterol total		
i. Desejável	< 5,17 mmol/L	< 200 mg/dL
ii. Limítrofe alto	5,17 a 6,18 mmol/L	200 a 239 mg/dL
iii. Alto	> 6,21 mmol/L	> 240 mg/dL
b. Colesterol LDL		
i. Ideal	< 2,59 mmol/L	< 100 mg/dL
ii. Acima do ótimo/quase ótimo	2,59 a 3,34 mmol/L	100 a 129 mg/dL
iii. Limítrofe alto	3,36 a 4,11 mmol/L	130 a 159 mg/dL
iv. Alto	4,14 a 4,89 mmol/L	160 a 189 mg/dL
v. Muito alto	> 4,91 mmol/L	> 190 mg/dL
c. Colesterol HDL		
i. Baixo	< 1,03 mmol/L	< 40 mg/dL
ii. Alto	> 1,55 mmol/L	60 mg/dL
d. Triglicerídeos (em jejum)	0,34 a 2,26 mmol/dL	30 a 200 mg/dL

(continua)

TABELA 56-11 Valores de referência para testes laboratoriais bioquímicos selecionados[1] *(continuação)*

Analito no sangue	Unidades SI[2]	Unidades internacionais
9. Testes de função hepática:		
a. Proteína Total	67 a 86 g/L	6,7 a 8,6 g/dL
b. Albumina	40 a 50 g/L	4,0 a 5,0 g/dL
c. Bilirrubina		
i. Total	5,1 a 22 μmol/L	0,3 a 1,3 mg/dL
ii. Direta	1,7 a 6,8 μmol/L	0,1 a 0,4 mg/dL
iii. Indireta	3,4 a 15,2 μmol/L	0,2 a 0,9 mg/dL
d. Alanina transaminase (ALT/SGPT)	0,12 a 0,70 μkat/L	7 a 41 U/L
e. Aspartato transaminase (AST/SGPT)	0,2 a 0,65 μkat/L	12 a 38 U/L
f. Fosfatase alcalina (ALP)	0,56 a 1,63 μkat/L	33 a 96 U/L
g. Gamaglutamil transferase (γGT/GGT)	0,15 a 0,99 μkat/L	9 a 58 U/L
10. Osmolalidade	275 a 295 mOsmol/kg	275 a 295 mOsmol/kg
11. Perfil da tireoide:		
a. Hormônio tireoestimulante (TSH)	0,34 a 4,25 mIU/L	0,34 a 4,25 μIU/mL
b. Tiroxina		
i. Livre	10,3 a 21,9 pmol/L	0,8 a 1,7 ng/dL
ii. Total	70 a 151 nmol/L	5,4 a 11,7 μg/dL
12. Troponina T	0 a 0,1 μg/L	0 a 0,1 ng/mL
13. Ácido úrico		
i. Homem	0,18 a 0,41 μmol/L	3,1 a 7,0 mg/100 dL
ii. Mulher	0,15 a 0,33 μmol/L	2,5 a 5,6 mg/dL
Líquido cerebrospinal (LCS)[3]		
1. Glicose	2,22 a 3,89 mmol/L	40 a 70 mg/dL
2. Proteína (lombar)	0,15 a 0,5 g/L	15 a 50 mg/dL
3. Hemácias	0	0
4. Leucócitos	0 a 5 células mononucleares/μL	0 a 5 células mononucleares/mm^3
Urina		
1. Acidez, titulável	20 a 40 mmol/dia	20 a 40 meq/dia
2. Creatinina	8,8 a 14 mmol/dia	1,0 a 1,6 g/dia
3. Albumina		
i. Normal	0,0 a 0,03 g/dia	0 a 30 mg/dia
ii. Microalbuminemia	0,03 a 0,30 g/dia	30 a 300 mg/dia
iii. Albuminúria clínica	> 0,3 g/dia	> 300 mg/dia
4. pH	5,0 a 9,0	5,0 a 9,0
5. Proteína total	< 0,15 g/dia	< 150 mg/dia

[1]Diversos fatores, como a população estudada, a duração e o meio de transporte da amostra, os métodos laboratoriais e instrumentação, etc., podem influenciar os valores de referência. Assim, os valores de referência ou "normais" fornecidos nesta tabela podem não ser apropriados para todos os laboratórios. Sempre que possível, os valores de referência fornecidos pelo laboratório que executa o exame devem ser utilizados na interpretação dos resultados laboratoriais.
[2]Recomenda-se que o sistema de unidades internacionais (SI) seja usado no relatório de todos os valores laboratoriais. Entretanto, muitos laboratórios e médicos preferem as "unidades convencionais" familiares e continuam utilizando-as para relatar e interpretar os resultados laboratoriais. Por esse motivo, ambos os sistemas são apresentados nesta tabela.
[3]Como as concentrações no LCS são valores em equilíbrio, recomenda-se a medição dos mesmos parâmetros em amostra de sangue obtida concomitantemente.
(Os resultados listados são do Harrison Medicina Interna, Fauci AS et al [editors], Apêndice: Valores Laboratoriais de Importância Clínica, por Kratz A et al, 17 edição. McGraw-Hill, 2008, com autorização.)

lor mínimo à meia-noite. A perda dessa variação diurna constitui um dos primeiros sinais de hiperfunção da suprarrenal. Por essa razão, as determinações do cortisol sérico em amostras de sangue coletadas às 8 horas e à meia-noite são úteis como teste de triagem. Um diagnóstico de hiperfunção suprarrenal é confirmado pela demonstração da incapacidade de supressão dos níveis de cortisol das 8 horas após a administração de 1 mg de dexametasona (um potente glicocorticoide sintético) à meia-noite (**teste de supressão com dexametasona**). A determinação do **hormônio adrenocorticotrópico** (ACTH) pode ajudar a diferenciar o hipercortisolismo devido à produção excessiva de ACTH (dependente de ACTH) das condições em que a produção de ACTH está normal ou suprimida (independente de ACTH). A ausência de elevação dos níveis séricos de cortisol após uma dose única de synacthen (um análogo sintético do ACTH) estabelece o diagnóstico de hipofunção suprarrenal (**teste de estimulação com synacthen**). Outros testes bioquímicos e exames de imagem (TC ou RM) podem ser necessários para diagnosticar a causa exata da hiper ou hipofunção suprarrenal.

A **Tabela 56-11** fornece uma lista dos principais exames laboratoriais bioquímicos realizados em muitos hospitais.

Existem numerosos outros testes bioquímicos que foram desenvolvidos, porém muitos deles só estão disponíveis em grandes laboratórios hospitalares regionais.

RESUMO

- Qualquer pesquisa laboratorial solicitada deve fornecer informações úteis para o diagnóstico, o prognóstico e o manejo do paciente e deve ser diretamente benéfica a ele.
- Um bom exame laboratorial deve ser exato e preciso. A exatidão refere-se ao grau de aproximação do valor "verdadeiro". A precisão refere-se à reprodutibilidade da análise.
- No processo de interpretação dos resultados de um teste, é preciso estar atento para a sensibilidade, a especificidade e o valor preditivo do teste. A sensibilidade refere-se à porcentagem de resultados positivos em pacientes com a doença. A especificidade refere-se à porcentagem de resultados negativos entre pessoas que não apresentam a doença. Um valor preditivo positivo refere-se à porcentagem de resultados positivos que são verdadeiros positivos. Os testes para diagnóstico devem ser altamente sensíveis e específicos.
- Diversas variáveis pré-analíticas podem afetar significativamente os resultados das medições dos analitos bioquímicos. Esses fatores precisam ser considerados quando se solicita um teste e quando os resultados são interpretados.
- A maioria dos laboratórios clínicos utiliza um alto grau de automatização para a análise dos exames de rotina.
- Os exames que fornecem informações sobre o funcionamento de determinados órgãos são frequentemente reunidos como testes de função orgânica.
- A depuração da creatinina fornece informações úteis sobre a taxa de filtração glomerular e, portanto, constitui um importante teste de função renal.
- A determinação do TSH, utilizando um imunoensaio acurado e sensível, geralmente constitui o primeiro teste realizado na avaliação da função da tireoide. São observados níveis elevados no hipotireoidismo primário e baixos níveis no hipertireoidismo primário.

REFERÊNCIAS

Beckett G, Walker S, Rae P, Ashby P: Clinical Biochemistry. 8th ed. Wiley-Blackwell, 2010.

Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE: Clinical Chemistry Techniques, Principles, Correlations. 6th ed. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, 2010.

Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (editors): Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 4th ed. Elsevier Saunders, 2006.

Gaw A, Murphy MJ, Cowan RA, et al: Clinical Biochemistry. 4th ed. Churchill Livingstone, 2008.

Kratz A, Pesce MA, Fink DJ: Appendix: Laboratory Values of Clinical Importance. Harrison's Principles of Internal Medicine. 17th ed. Fauci AS et al (editors). McGraw-Hill, 2008.

Krieg AF, Gambino R, Galen RS: Why are clinical laboratory tests performed? When are they valid? JAMA 1975;233:76.

Lab Tests Online: www.labtestsonline.org (A comprehensive web site provided by the American Association of Clinical Chemists that provides accurate information on most if not all the lab tests mentioned in this text).

Laposaka M: Laboratory Medicine. McGraw-Hill Lange, 2010.

MedlinePlus: http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/encyclopedia.html (The A.D.A.M. Medical Encyclopedia includes over 4000 articles about diseases, lab tests and other matters)

CAPÍTULO 57

Estudos de Caso Bioquímicos

Robert K. Murray, M.D., Ph.D. e
Peter L. Gross, M.D., M.Sc., FRCP(C)

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Reconhecer a importância de um conhecimento sólido de bioquímica e genética na compreensão e gestão de muitas condições clínicas.
- Compreender as características gerais e alguns aspectos da gestão das seguintes condições: deficiência da adenosina desaminase; doença de Alzheimer; cólera; câncer colorretal; fibrose cística; cetoacidose diabética; distrofia muscular de Duchenne; intoxicação aguda por etanol; gota aguda; hemocromatose hereditária; hipotireoidismo primário; *kwashiorkor* e desnutrição energético-proteica; infarto do miocárdio; obesidade; osteoporose primária; xeroderma pigmentosa.

INTRODUÇÃO

Neste capítulo final, 16 estudos de caso são apresentados e discutidos. Eles ilustram a importância do conhecimento de bioquímica para a **compreensão das doenças**. É claro que, como demonstrado ao longo deste livro, a bioquímica também é crucial para a **compreensão da saúde e do bem-estar**.

A maioria das doenças discutidas aqui é **prevalente**, ou relativamente prevalente, em um sentido global (prevalência é a proporção de pessoas, em determinada população, que possui certa doença em um momento ou intervalo de tempo). Entretanto, duas doenças (xeroderma pigmentosa e doença de imunodeficiência combinada grave devido à deficiência da adenosina desaminase [ADA]) são relativamente raras. Elas foram incluídas porque ilustram dois fatos biológicos cruciais: a importância do **reparo do DNA** e do **sistema imune** como mecanismos protetores. Além disso, a deficiência da ADA é a primeira doença para a qual a **terapia gênica** foi realizada em humanos.

Os **valores de referência** para os testes laboratoriais citados nos casos a seguir podem ser diferentes daqueles listados por laboratórios com os quais o leitor esteja familiarizado. Isso porque os valores de referência de diferentes laboratórios variam um pouco, em parte devido a distintas metodologias. Neste capítulo, os resultados de laboratório são geralmente apresentados em **unidades SI** (Sistema Internacional de Unidades). O Capítulo 56 apresenta alguns dos princípios básicos envolvidos na ordenação e interpretação de testes laboratoriais. A **Tabela 56–11** lista a maioria dos valores normais para os testes laboratoriais referidos nesse capítulo, e fornece valores tanto em unidades SI quanto em unidades "convencionais" (como amplamente utilizado nos Estados Unidos).

As **doses dos medicamentos** administrados no tratamento dos casos descritos aqui não são geralmente determinadas; o leitor deve verificá-las por conta própria.

CASO 1: DEFICIÊNCIA DA ADENOSINA DESAMINASE (ADA) LEVANDO À DOENÇA DE IMUNODEFICIÊNCIA COMBINADA GRAVE (SCID)

Etiologia

Genética (devido a mutações no gene que codifica a ADA). A deficiência da ADA afeta o sistema imune.

História e exame físico

Uma menina de 11 meses de idade foi levada por seus pais a um hospital infantil. Ela havia tido uma série de ataques de pneumonia e aftas (infecção oral frequentemente provocada por *Candida albicans*) desde o nascimento. Os principais achados após um exame detalhado foram níveis muito baixos de linfócitos circulantes (i.e., linfopenia grave) e níveis baixos de imunoglobulinas circulantes. O pediatra assistente suspeitou de SCID (doença de imunodeficiência combinada grave).

Achados laboratoriais

A análise de uma amostra de hemácias revelou uma atividade muito baixa da ADA e também um nível muito elevado (cerca de 50 vezes o normal) de dATP. Esses achados confirmaram o diagnóstico de SCID devido à deficiência da ADA, a enzima que converte a adenosina em inosina (Capítulo 33):

$$\text{Adenosina} \rightarrow \text{Inosina} + NH_4^+$$

Tratamento

Foi iniciado tratamento **antibiótico** adequado e, em conjunto, injeções periódicas de **imunoglobulinas**. Além disso, a paciente iniciou um tratamento com injeções intramusculares semanais de **ADA bovina conjugada com polietilenoglicol**. A ADA bovina é relativamente não imunogênica, e sua conjugação ao polietilenoglicol prolonga a sua meia-vida. Foi demonstrado que ela é benéfica no tratamento da deficiência da ADA. Seus pais foram informados que um **transplante de medula óssea** era a terapia mais adequada, mas o tratamento foi recusado. Diante dos relatos de sucesso da **terapia genética com a ADA**, esse tratamento foi oferecido, e seus pais consentiram. O tratamento foi aprovado pelo Comitê de Ética do hospital. Os linfócitos e as células mononucleares foram isolados do seu sangue pela utilização de um gradiente de Ficoll (um polissacarídeo neutro altamente ramificado). Eles, então, foram cultivados em presença de interleucina 2 (para estimular a divisão celular) e infectados com um retrovírus modificado contendo inserções codificadoras de ADA e também um gene (o gene NeoR) que codifica uma enzima que regula a resistência à neomicina, que foi utilizado para mostrar que a transferência do gene tinha sido alcançada. Uma alternativa, nos dias atuais, seria a utilização de **células-tronco da medula óssea** (que tem sido apontada como promotora de um aumento significativo em ambas as células B e T), mas esse procedimento não estava disponível no momento do tratamento. As células autólogas tratadas com o gene foram então injetadas por via intravenosa. A criança recebeu injeções semelhantes uma vez por mês ao longo do ano seguinte, além de continuar a receber a ADA conjugada com o polietilenoglicol. A mensuração da atividade da ADA revelou uma elevação constante (cerca de 20% do normal) da enzima nos linfócitos circulantes após seis meses de tratamento; análises utilizando a técnica de PCR com sondas NeoR revelou que aproximadamente a mesma porcentagem de linfócitos continha o material genético inserido.

Discussão

A deficiência de atividade da ADA é uma condição hereditária **autossômica recessiva**. Ela é responsável por aproximadamente 15% dos casos de SCID; outras causas envolvem mutações em vários genes que afetam a função de células do sistema imune. A maioria das mutações do gene para ADA até agora detectadas foram de substituições de bases, embora deleções também tenham sido detectadas. Essas mutações resultam na diminuição da atividade ou estabilidade da ADA. O bloqueio da atividade da ADA resulta no acúmulo de adenosina que, por sua vez, resulta no acúmulo de desoxiadenosina e **dATP**. Níveis elevados de dATP são tóxicos, particularmente para os **linfócitos T**, que normalmente exibem uma alta atividade de ADA. Portanto, os linfócitos são danificados ou mortos, levando a um **comprometimento tanto da imunidade humoral quanto celular**, porque o comprometimento das funções da célula T pode afetar secundariamente o funcionamento da célula B.

A deficiência da adenosina desaminase se tornou muito conhecida porque é a primeira doença a ser tratada por terapia genética de células somáticas. Vários pacientes têm sido tratados por protocolos semelhantes ao descrito anteriormente, o qual é um exemplo de terapia genética ***ex vivo*** (os linfócitos e as células mononucleares foram removidos do corpo antes da inserção do gene da ADA). Uma razão para a seleção de deficiência da ADA como uma condição adequada para a terapia de genes somáticos foi que as células que expressam o gene para ADA teriam uma **vantagem seletiva para o crescimento** sobre as células não corrigidas. A terapia genética é discutida brevemente no Capítulo 39. Aspectos importantes envolvidos na terapia gênica incluem o **nível de expressão** da proteína afetada, o qual deve ser suficiente para manter a função normal; que, idealmente, o gene inserido deva mostrar **regulação normal**; e que não devam ocorrer quaisquer **efeitos colaterais indesejados significativos** (p. ex., câncer devido à mutagênese insercional). Em relação a este último ponto, o gene que está sendo administrado pode se inserir em um gene que seja essencial para o crescimento celular normal, e, se isso ocorrer, a célula pode se tornar cancerosa (um exemplo de **mutagênese insercional**), como foi observado em alguns casos de terapia gênica.

Um esquema simplificado dos eventos envolvidos na promoção de deficiência da ADA é mostrado na **Figura 57-1**. Tratamento seguro e efetivo da deficiência da ADA por terapia gênica foi relatado recentemente (ver Referências).

CASO 2: DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)

Antes de estudar este caso, aconselha-se o leitor a consultar o material sobre DA no Capítulo 5.

Etiologia

A deposição do **peptídeo amiloide** β ($A\beta_{42}$) em certas partes do cérebro é considerada por muitos neurocientistas como uma

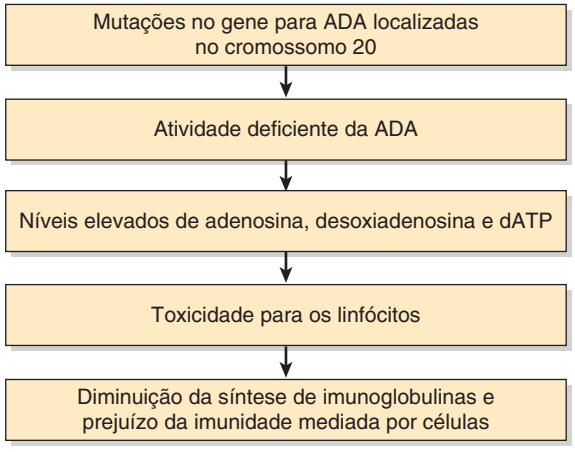


FIGURA 57-1 Resumo de eventos prováveis na promoção de SCID devido à deficiência de ADA (OMIM 102700).

das principais causas da DA. Acredita-se que esse peptídeo de 42 aminoácidos, que ocorre como folhas beta, oligomeriza-se e é depositado em volta dos neurônios; os oligômeros podem ser tóxicos para os neurônios. A deposição de $A\beta_{42}$ pode se dever à formação excessiva ou à diminuição da depuração do peptídeo. Em certos casos de DA **familiar**, genes específicos foram identificados (p. ex., os que codificam a proteína precursora amiloide [APP], presenilinas 1 e 2 e a apolipoproteína E4), que afeta a produção ou a remoção de $A\beta_{42}$.

História e exame físico

Uma mulher de 72 anos de idade, que vivia sozinha, foi encontrada perambulando pelo seu bairro às duas horas da manhã. Seu marido havia morrido há três anos e seu único filho vivia a certa distância. A senhora estava confusa e foi levada ao hospital. O filho foi notificado e veio imediatamente para ver sua mãe. Ela não era capaz, no momento da admissão, de fornecer uma história clara. O filho revelou que ela havia sido diagnosticada por um neurologista como tendo DA inicial, mas que havia se recusado a ir para um asilo. Ela recebia ajuda em casa durante o dia, e nunca vagou antes fora de casa. Algumas vezes, uma amiga a visitava e passava a noite em sua casa. De fato, ela parecia relativamente normal até a presente situação, pois seu filho lhe falava ao telefone, todos os dias da semana. Entretanto, sua memória de curto prazo havia piorado nos últimos meses, e ele passou a se preocupar com ela. Ela tomava um medicamento (donepezil) para DA. Por outro lado, ela não tinha nenhuma história médica significativa. Ela foi mantida no hospital por alguns dias, durante os quais seu médico de família e o neurologista foram consultados.

Tratamento

Não há **tratamento específico** para DA até o presente momento. O donepezil e vários outros medicamentos usados no manejo da DA são **inibidores da atividade da colinesterase**, enzima que hidrolisa a acetilcolina (ACh) em acetato e colina. Eles são utilizados porque alguns estudos mostraram níveis abaixo do normal de ACh em amostras de cérebros de indivíduos que faleceram devido à DA. Eles parecem produzir uma discreta melhora da função cerebral e da memória em alguns pacientes. A memantina, fármaco que antagoniza os **receptores *N*-metil-D-aspartato**, pode levar a uma diminuição da progressão da DA. Sintomas como depressão, agitação, ansiedade e insônia podem ser tratados por medicamentos adequados e antipsicóticos podem ser necessários em casos de psicose. Um possível papel preventivo dos **ácidos graxos ômega 3** está sendo estudado. Entretanto, de modo geral, ainda não há uma **terapia efetiva** para DA. A paciente foi então mantida com donepezil e admitida em um asilo especializado em casos de pacientes com DA. Além da alta qualidade em cuidados básicos, o asilo ofereceu uma variedade de programas como musicoterapia e exercícios físicos.

Discussão

A DA é uma condição neurodegenerativa progressiva na qual ocorre um **declínio da função cognitiva geral**, geralmente acompanhado por **distúrbios afetivos** e **comportamentais**. Pelo menos dois milhões de pessoas nos Estados Unidos sofrem de DA, e sua prevalência tende a aumentar, à medida que mais pessoas vivem por mais tempo. Alguns casos têm base **familiar** (**genética**), mas a grande maioria (cerca de 90%) parece ser **esporádica**. A DA é a causa mais comum de **demência**, que pode ser definida como um declínio progressivo das funções intelectuais, devido a uma causa orgânica, que interfere substancialmente nas atividades de um indivíduo. A DA coloca um enorme fardo sobre as famílias e no sistema de saúde, visto que, cedo ou tarde, os pacientes não poderão cuidar de si mesmos. A idade habitual de início é acima dos 65 anos, mas a doença pode ter um aparecimento mais precoce (p. ex., aos 40 anos), particularmente nos casos em que há uma predisposição genética (ver adiante). A sobrevida varia de dois a 20 anos. Estima-se que cerca de 40% das pessoas acima de 85 anos de idade possua graus variáveis da DA. A **perda da memória de curto prazo** é, com frequência, o primeiro sinal. A DA, em geral, **progride** inexoravelmente, e muitos pacientes são, por fim, completamente incapacitados.

O **diagnóstico** é realizado, muitas vezes, por exclusão. Um exame neurológico completo é necessário e também um exame reconhecido da condição mental. Outras formas de demência (corpo de Lewy, vascular, etc.) devem ser excluídas, bem como outros problemas orgânicos e psiquiátricos; vários testes laboratoriais podem, portanto, ser designados para isso. Em certos casos, um exame de CT e MRI podem ser indicados; eles geralmente revelam graus variáveis de atrofia cortical e aumento dos ventrículos se a DA estiver presente. Várias pesquisas estão em andamento para **desenvolver testes laboratoriais** (p. ex., no sangue e no líquido cerebrospinal) que ajudarão a fazer um diagnóstico inequívoco da DA.

O **quadro patológico** básico é de um processo degenerativo caracterizado pela morte e consequente perda de células em certas áreas do cérebro (p. ex., o córtex, o hipocampo e outros locais). A **apoptose** (tipo de morte celular programada, em que vários mecanismos, particularmente as atividades das enzimas proteolíticas conhecidas como caspases, são ativados dentro de uma célula levando à morte celular rapidamente, ver Capítulo 55) pode estar envolvida na morte celular que ocorre na DA. No nível microscópico, **placas neuríticas** contendo agregados do peptídeo β amiloide (Aβ, um peptídeo de 42 aminoácidos, que ocorre em folhas beta), rodeadas por células nervosas que contêm **emaranhados neurofibrilares** (filamentos helicoidais pareados formados a partir de uma forma hiperfosforilada da proteína associada a microtúbulos, a **tau**), são características. Depósitos de $A\beta_2$ são frequentes em pequenos vasos sanguíneos.

Intensa investigação está em andamento para determinar a causa da DA. Interesse especial concentrou-se na presença de $A\beta_{42}$, o principal constituinte das placas encontradas na DA. O termo "amiloide" se refere a um grupo de diversos depósitos de proteína extracelular encontrado em doenças muito diferentes (ver Capítulo 50). As proteínas amiloides geralmente se colorem de azul com o iodo, como o amido, o que explica o seu nome (amilo significa amido). A **hipótese da cascata amiloide** propõe que a deposição de $A\beta_{42}$ seja a causa das alterações patológicas observadas nos cérebros de vítimas da DA, e que outras alterações, tais como os emaranhados neurofibrilares e as alterações vasculares, sejam secundárias. A $A\beta_{42}$ é derivada de um precursor proteico maior denominado de **proteína precursora amiloi-**

de (**APP**), cujo gene está localizado no cromossomo 21, próximo à área afetada na síndrome de Down (trissomia do 21). Indivíduos com síndrome de Down que sobrevivem à idade de 50 anos com frequência sofrem de DA.

Como mostrado na **Figura 57-2**, a APP é uma proteína transmembrana que pode ser clivada por proteases conhecidas como secretases. Na etapa 1, a APP é clivada pela β-secretase ou α-secretase para produzir pequenos produtos não tóxicos. A seguir, na etapa 2, a clivagem do produto da β-secretase pela γ-secretase produz tanto o peptídeo tóxico $A\beta_{42}$ (contendo 42 aminoácidos) quanto o peptídeo não tóxico $A\beta_{40}$. A clivagem do produto da α-secretase pela γ-secretase produz o peptídeo P3 não tóxico. Quando se separa de sua proteína parental, a $A\beta_{42}$ forma um depósito extracelular insolúvel. Acredita-se que a **agregação** de $A\beta_{42}$, produzida por sua **oligomerização** e formação das **folhas beta**, seja o evento fundamental na causa da DA. Estudos recentes sugerem que a **incapacidade na depuração** de $A\beta_{42}$ pode ser uma parte importante do problema na DA.

Mutações em certos genes foram encontradas em alguns pacientes com DA (DA familiar). Essas mutações com frequência predispõem ao início precoce da DA. Um desses genes é o que codifica a APP. A **Tabela 57-1** resume alguns aspectos dos principais genes descobertos até agora. Em geral, os efeitos dos produtos desses genes são os de estimular a deposição de amiloide ou diminuir sua remoção. A dissecção precisa desses mecanismos de ação está em andamento.

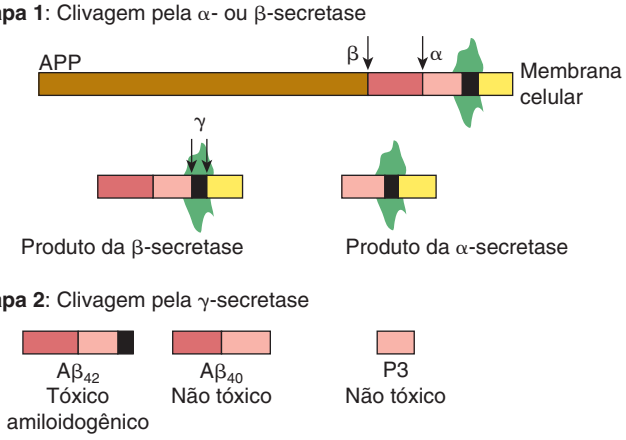


FIGURA 57-2 Esquema simplificado da formação da $A\beta_{42}$. A proteína precursora amiloide (APP) é digerida pelas β-, α- e γ- secretases. Um passo principal inicial (**Etapa 1**) é a digestão ou pela β-secretase ou pela α-secretase, produzindo produtos menores não tóxicos. A clivagem do produto da β-secretase pela γ-secretase (**Etapa 2**) resulta ou no peptídeo tóxico $A\beta_{42}$ (contendo 42 aminoácidos) ou no peptídeo não tóxico $A\beta_{40}$. A clivagem do produto da α-secretase pela γ-secretase produz o peptídeo não tóxico P3. O excesso de produção de $A\beta_{42}$ é um iniciador fundamental do dano celular na doença de Alzheimer (DA). Entre os esforços de pesquisa sobre DA, se encontram tentativas de desenvolver terapias para reduzir o acúmulo de $A\beta_{42}$ pela inibição das β- ou γ-secretases, promovendo a atividade da α-secretase ou depurando a $A\beta_{42}$ pelo uso de anticorpos específicos. (Reproduzida, com permissão, de Fauci AS et al [editores] *Harrison's Principles of Internal Medicine,* 17th ed,McGraw-Hill, 2008, p. 2542).

TABELA 57-1 alguns genes envolvidos em tipos familiares de Doença de Alzheimer (AD)[1]

Gene	Tipo de AD	Cromossomo	Produto proteico
APP	DA1, Familiar (OMIM 104300)	21	APP
APOE4	DA2, Início tardio (OMIM 104310)	19	ApoE4
PS1	AD3, Início precoce (OMIM 104311)	14	Presenilina 1
PS2	AD4, Familiar (OMIM 606889)	1	Presenilina 2

[1]Em geral, os produtos desses genes atuam aumentando a produção de $A\beta_{42}$ (APP, PS1 e PS2) ou diminuindo a sua depuração (APOE4). As presenilinas 1 e 2 podem estar envolvidas na ação da γ-secretase.
Abreviações: APOE4, apolipoproteína E4; APP, proteína precursora amiloide; OMIM, número de catálogo na Herança Mendeliana Humana Online; PS, presenilina.

Uma segunda parte da hipótese da cascata amiloide é que Aβ ou fragmentos que contêm Aβ são direta ou indiretamente **neurotóxicos**. Há evidência de que a exposição de neurônios à Aβ pode aumentar suas concentrações intracelulares de **Ca^{2+}**. Algumas **proteinoquinases**, incluindo aquela envolvida na fosforilação da **tau**, são reguladas pelos níveis de Ca^{2+}. Assim, o aumento do Ca^{2+} pode levar à hiperfosforilação da tau e à formação de filamentos helicoidais pareados presentes nos emaranhados neurofibrilares. A interferência com a **função sináptica** é também provável, talvez secundária ao dano neuronal.

Pesquisas adicionais podem revelar desenvolvimentos inesperados que poderão alterar a validade da teoria da cascata amiloide como apresentada acima.

Trabalhos em DA mostraram a provável importância de um **peptídeo dobrado anormalmente** na causa dessa importante doença cerebral. Espera-se que mais pesquisas sobre DA possam resultar em medicamentos que irão prevenir, estacionar, ou mesmo reverter a DA. Por exemplo, é possível **desenvolver pequenas moléculas** que evitem a formação ou a deposição de $A\beta_{42}$, que impedem sua agregação ou que aceleram a sua depuração. Além disso, é possível que anticorpos específicos para $A\beta_{42}$ ou tau possam evitar suas ações tóxicas putativas.

A DA é uma das chamadas **doenças conformacionais** (Capítulos 46 e 50), em que proteínas dobradas anormalmente desempenham um papel central na causa da doença. Outros exemplos dessas doenças são a fibrose cística (neste capítulo), a deficiência de $alfa_1$-antitripsina (Capítulo 50) e as doenças de príon (Capítulo 5).

O estudo de **várias doenças neurodegenerativas** vem fornecendo evidências dramáticas da **importância da estrutura e função das proteínas** em suas causas. Por exemplo, formas anormais da proteína huntingtina desempenham um importante papel na doença de Huntington, anormalidades na α-sinucleína contribuem na ocorrência de alguns casos da doença de Parkinson, e príons são importantes na causa da encefalopatia espongiforme bovina (BSE) e na doença de Creutzfeldt-Jacob. A aplicação de técnicas genômicas e proteômicas também está contribuindo

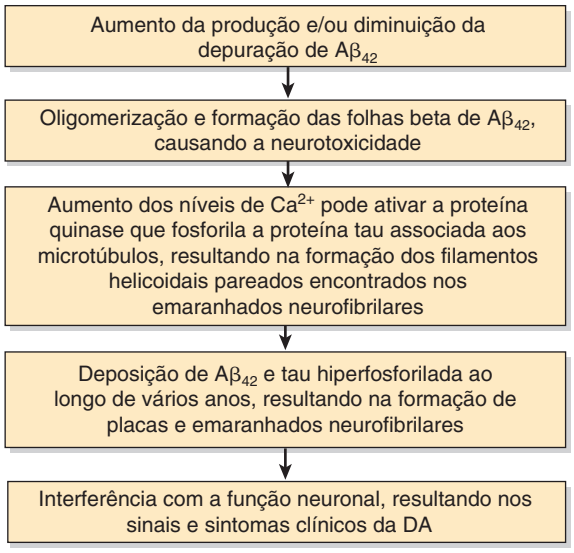


FIGURA 57-3 Um esquema tentativo da sequência possível de eventos em pelo menos alguns casos de DA.

para a etiologia de importantes transtornos psiquiátricos, como o transtorno bipolar e a esquizofrenia. A importância das abordagens genéticas e bioquímicas na compreensão dos processos das doenças nunca foi tão clara. Um esquema simplificado das causas da DA é mostrado na **Figura 57-3**.

CASO 3: CÓLERA

Etiologia

Infecção por *Vibrio cholerae.*

História e exame físico

Uma estudante de medicina de 21 anos de idade, trabalhando em um país em desenvolvimento, começou a apresentar repentinamente fezes aquosas em profusão, quase que continuamente. Ela logo começou a vomitar, e seu estado geral decaiu rapidamente, sendo levada às pressas para o hospital local. Na admissão, ela estava cianótica, com o turgor da pele diminuído, sua pressão arterial era de 70/50 mmHg (a normal é de 120/80 mmHg), e seu pulso era rápido e fraco. O médico de plantão diagnosticou cólera, colheu uma amostra de fezes, e iniciou o tratamento imediatamente.

Tratamento

O tratamento consistiu na administração **intravenosa** de uma solução preparada no hospital contendo 5 g de NaCl, 4 g de $NaHCO_3$ e 1 g de KCl por litro de água destilada livre de pirógeno. Essa solução foi inicialmente administrada rapidamente (100 mL por hora) até que sua pressão arterial e seu pulso se normalizassem. Foi administrado, também, o antibiótico **doxiciclina**. No segundo dia, ela foi capaz de tomar a **solução de reidratação oral** recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o tratamento de cólera, que consiste em 20 g de glicose, 3,5 g de NaCl, citrato trissódico, 2,9 g de di-hidrato (ou 2,5 g de $NaHCO_3$) e 1,5 g de KCl por litro de água.

A paciente tomou uma quantidade de líquido que excedeu moderadamente o volume de suas fezes diárias. Os **alimentos sólidos** foram reintroduzidos no quarto dia após a admissão. Ela continuou a se recuperar rapidamente e recebeu alta hospitalar sete dias após a admissão.

Discussão

O cólera é uma importante doença infecciosa endêmica em alguns países da Ásia e em outras partes do mundo. A contaminação fecal da água e dos alimentos é a principal via de transmissão. Ela é devida à *Vibrio cholerae*, uma bactéria que secreta uma proteína, a **enterotoxina**. A toxina é, de fato, codificada por um bacteriófago (CTXϕ) residente na *V. cholerae*. A enterotoxina é composta por **uma subunidade A** (composta por um peptídeo A1 e um peptídeo A2 unidos por uma ponte dissulfeto) e **cinco subunidades B**, e tem um peso molecular de aproximadamente 84 kDa. No intestino delgado, a toxina se liga por meio das **subunidades B** ligadas ao **gangliosídeo GM1** (Figura 15–17) presente na membrana plasmática de células da mucosa (**Figura 57-4**). A subunidade A, então, se dissocia, e o **peptídeo A1** passa através da face interna da membrana plasmática. Ela catalisa a **ADP-ribosilação** (utilizando o **NAD^+** como doador) do componente regulador de ligação do GTP (G_s) da adenilil-ciclase, causando *up-regulation* a atividade dessa enzima. Assim, a **adenilil-ciclase** se torna cronicamente ativada (Capítulo 42). Isso resulta na elevação do **AMPc**, que ativa a **proteinoquinase A** (PKA). Isto, por sua vez, por meio da fosforilação de CFTR e de um trocador de $Na^+ - H^+$, leva à **inibição da absorção de Na^+** e ao **estímulo da secreção de Cl^-**. Portanto, grandes quantidades de NaCl se acumulam no lúmen intestinal, atraindo a água por osmose e contribuindo para as fezes líquidas, características do cólera.

A toxina do cólera também pode afetar **outras moléculas** envolvidas na secreção intestinal (p. ex., prostaglandinas e receptores de histamina dos nervos). A estrutura histológica do intestino delgado permanece notavelmente não afetada, apesar da perda de grandes quantidades de Na^+, Cl^-, água, HCO_3 e K^+. É a perda desses componentes que resulta na acentuada perda de líquido (desidratação), diminuição do volume sanguíneo, acidose e depleção de K^+ encontrados nos casos graves de cólera, e que podem ser fatais se a terapia de reposição adequada (como descrita anteriormente) não for iniciada imediatamente. Um paciente com cólera pode perder até 1 L de líquido por hora.

O reconhecimento e a fácil disponibilidade de líquidos de reposição adequados, tais como a **solução de reidratação oral**, levaram a uma grande melhoria no tratamento do cólera. Deve-se destacar que a **glicose** é um componente essencial da solução de reidratação oral (Capítulo 40). A toxina do cólera inibe a absorção de Na^+ pelas células intestinais, mas não inibe o transporte de Na^+ facilitado por glicose para essas células e, portanto, a glicose será absorvida e utilizada para o fornecimento de energia.

A **Figura 57-5** resume os mecanismos envolvidos na etiologia da diarreia do cólera.

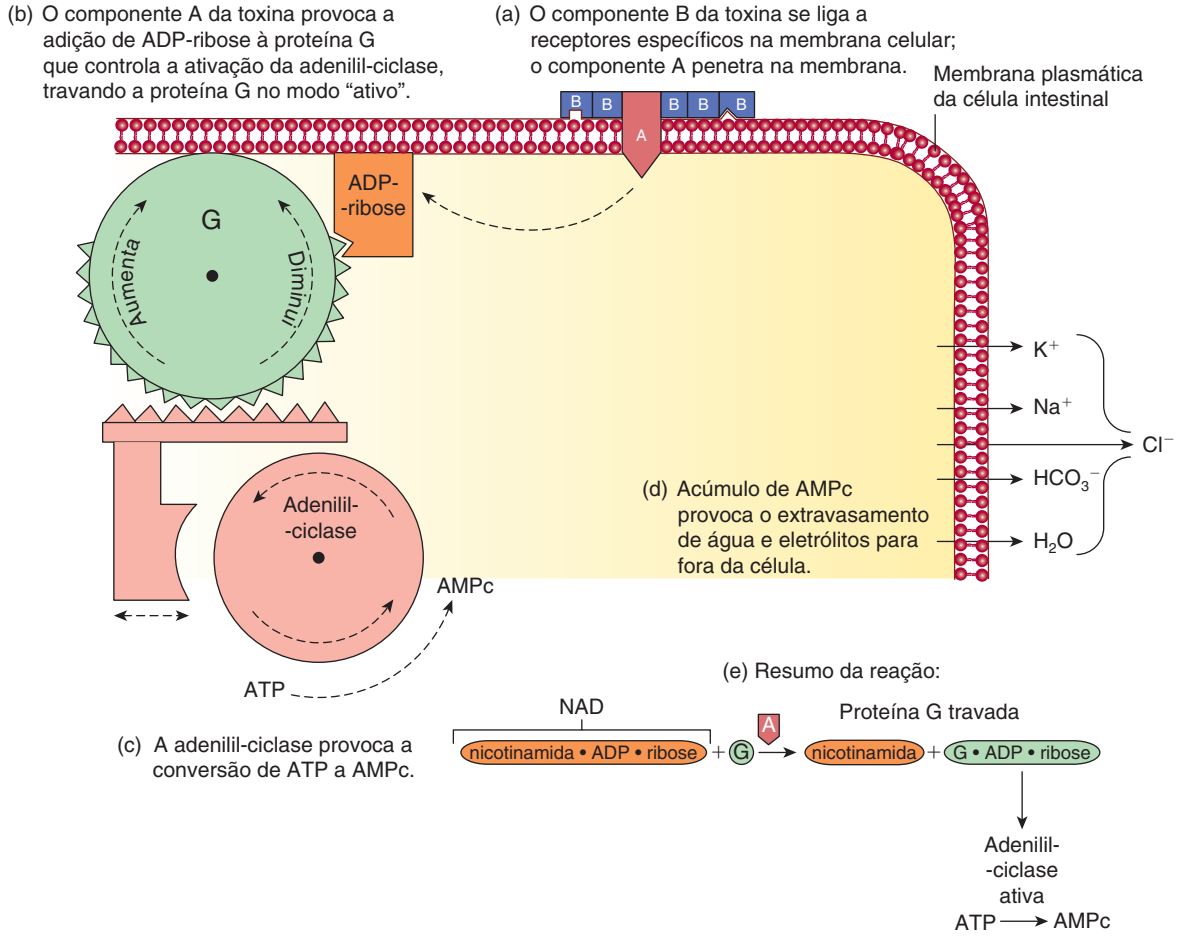


FIGURA 57-4 Representação diagramática do mecanismo de ação da toxina colérica (CT). A toxina se prende à membrana plasmática por meio da interação de suas subunidades B com o gangliosídeo GM_1. A subunidade A atravessa a membrana e catalisa a adição do componente ADP-ribose do NAD^+ à proteína G envolvida na estimulação da adenilil-ciclase ($NAD^+ \rightarrow$ ADP-ribose + nicotinamida). A adição de ADP-ribose à proteína G trava a adenilil-ciclase em sua conformação ativa, aumentando o nível intracelular de AMPc. Isto leva à fosforilação de vários transportadores de membrana, resultando no acúmulo de íons (mostrado na figura) e de água no lúmen intestinal, produzindo, assim, frequente diarreia massiva. (Reproduzida, com permissão, de Nester EW et al, Microbiology: A Human Perspective,5th ed. McGraw Hill, 2007).

CASO 4: CÂNCER COLORRETAL

Etiologia

Ambiental e genética. A maioria, se não todos os tipos de câncer, se origina da ocorrência de mutações em genes importantes que regulam o crescimento celular (oncogenes e genes supressores de tumor, ver Capítulo 55). As mutações podem ser hereditárias, mas há, com mais frequência, influências ambientais (p. ex., substâncias químicas, radiação e alguns vírus) envolvidas.

História, exame físico e resultados de testes

Um homem de 62 anos de idade consultou seu médico de família. Ele havia notado a presença de sangue vivo em suas fezes várias vezes nos últimos três meses, que ele atribuiu a hemorroidas. Nos últimos 12 meses, seu apetite diminuiu e ele perdeu cerca de 4,5 kg. Ele sempre teve boa saúde até o último ano, e não tomava qualquer medicamento. Ele não apresentava outras queixas.

Em vista da história de sangramento retal, perda de peso e da idade do paciente, o médico suspeitou de câncer colorretal e requisitou três amostras de fezes colhidas em três dias consecutivos para o **teste de sangue oculto nas fezes**. Pouco tempo depois, o médico recebeu o relato de que o exame era positivo. Ele também solicitou um **hemograma completo**, níveis de ferro sérico, capacidade de fixação do ferro e ferritina. Os resultados mostraram anemia microcítica (ver Capítulo 52), frequentemente encontrada em pacientes com câncer colorretal devido ao sangramento do tumor. Um exame retal foi negativo. Nenhuma anormalidade foi observada nas radiografias de tórax. O médico agendou uma consulta após quatro dias com um gastroenterologista. A **colonoscopia**, realizada uma semana depois, revelou a presença de um tumor moderadamente grande (aproximadamente 5 × 6 cm) no meio do colo transverso. Foi solicitada tam-

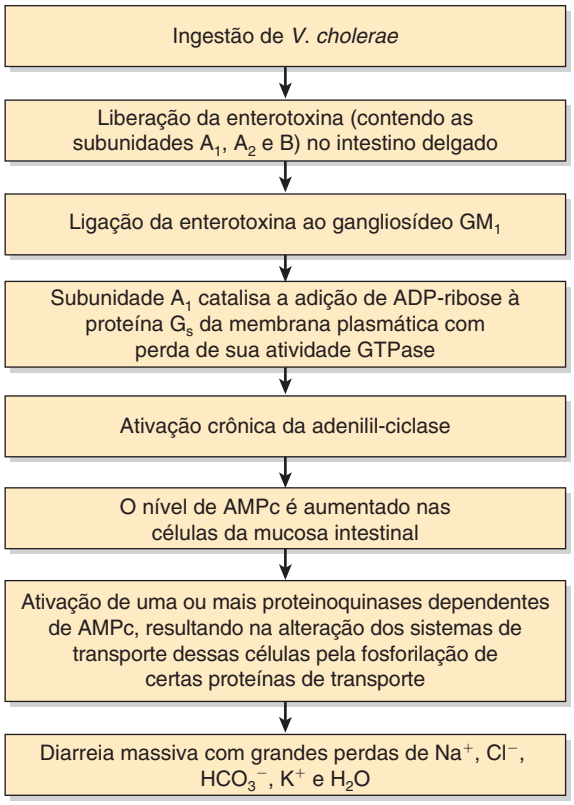


FIGURA 57-5 Resumo dos mecanismos envolvidos na etiologia da diarreia do cólera.

bém a medição do **antígeno carcinoembrionário** (CEA), um biomarcador para câncer colorretal (ver adiante para mais comentários e também o Capítulo 7). Ele estava elevado (20 μg/L, normal 0 a 3 μg/L). A **cirurgia** foi marcada para duas semanas depois, quando o tumor foi ressecado, e foi realizada uma anastomose ponta a ponta. Os linfonodos regionais também foram extirpados e encaminhados, junto à biópsia do tumor, para o laboratório de anatomia patológica. Não foi observada invasão local do tumor, e nenhum outro tumor foi encontrado no abdome, inclusive no fígado. O relato do exame patológico subsequente descreveu o tumor como um adenocarcinoma relativamente bem diferenciado, invadindo a mucosa muscular. Nenhuma célula tumoral foi observada nos gânglios linfáticos; nenhuma metástase a distância foi notada no momento da cirurgia. O estadiamento TNM era T1N0M0 (câncer limitado à mucosa e submucosa, com uma taxa de sobrevivência de aproximadamente cinco anos acima de 90% [T = tumor, N = nódulos, M = metástases]). (O leitor interessado deve verificar o estadiamento de tumores do intestino grosso em um livro de patologia.) Diante desses achados, não foi considerado necessário nenhum tratamento quimio ou radioterápico. A determinação do CEA várias semanas após a cirurgia mostrou que ele havia decaído para níveis normais. O paciente foi aconselhado a retornar para acompanhamento, em intervalos regulares, quando, entre outros testes, amostras de sangue para determinação do CEA foram solicitadas, as quais permaneceram nos níveis normais. Uma colonoscopia de acompanhamento foi realizada três anos após a cirurgia; nenhum tumor foi observado no colo. O paciente estava vivo e bem até cinco anos após a cirurgia.

Discussão

Muitos aspectos da bioquímica do câncer são discutidos no Capítulo 55. As Figuras 55–1 e 55–2 resumem características importantes exibidas pelas células cancerosas. Aqui, serão focados alguns poucos aspectos específicos do câncer colorretal e também o uso do CEA como um marcador tumoral.

O **câncer colorretal** é o segundo câncer mais comum nos Estados Unidos, sendo o câncer de pulmão o primeiro. Ele pode ocorrer em qualquer porção do intestino grosso, embora o reto seja o local mais comum. Cerca de 95% dos tumores malignos do intestino grosso são adenocarcinomas (cânceres de origem epitelial que surgem a partir de estruturas glandulares). Cerca de 10% dos cânceres colorretais ocorrem no colo transverso. Neste caso, embora o tumor fosse moderadamente grande, não ocorreu nenhuma extensão além do local primário, nenhum nódulo local estava envolvido, e não ocorreu nenhuma metástase a distância. Isso foi uma sorte para o paciente, pois significou que havia um excelente prognóstico e que não havia necessidade de submissão à quimio ou radioterapia.

A maioria dos carcinomas colorretais se origina de **pólipos adenomatosos**. Um pólipo é uma protuberância da membrana mucosa, geralmente benigna. Há vários tipos de pólipos. O de interesse aqui é o pólipo adenomatoso. A maioria dos tumores de colo surge de tais pólipos, embora a maior parte desses pólipos não progrida para o câncer.

Há várias **síndromes genéticas** bem definidas que predispõem para o câncer colorretal. A mais comum é o **câncer colorretal não poliposo hereditário** (HNPCC), no qual estão envolvidas mutações em vários genes ligados ao reparo do pareamento errôneo do DNA (ver Capítulo 35). Outra condição relativamente rara é a **polipose adenomatosa familiar** (polipose adenomatosa do colo, APC), em que centenas ou milhares de pólipos aparecem no colo e reto. O **gene *APC*** está localizado no cromossomo 5q21 e várias mutações foram descritas. No geral, estima-se que aproximadamente 20% dos cânceres colorretais tenham uma base genética.

Vários **fatores ambientais** estão envolvidos na etiologia do câncer colorretal. Eles incluem dietas ricas em **gordura saturada**, altas em **calorias**, pobres em **cálcio** e pobres em **fibras**. Exatamente como cada um desses fatores propostos opera é o tema de investigações em andamento. Por exemplo, a dieta gordurosa parece estimular a produção de colesterol e ácidos biliares pelo fígado. Quando os ácidos biliares são excretados para dentro do intestino, enzimas de bactérias podem agir sobre eles convertendo-os em ácidos biliares secundários, que se acredita serem promotores de tumor. Um **promotor de tumor** é uma molécula que, junto a um **iniciador** (i.e., uma molécula que causa uma mutação no DNA) leva uma célula a se tornar cancerosa. A **doença inflamatória do intestino** (p. ex., colite ulcerativa) é outro fator predisponente para o câncer colorretal.

Os trabalhos pioneiros de Vogelstein e colaboradores sobre a sequência de alterações que ocorrem **nos genes supressores de tumores e nos oncogenes** no epitélio displásico, pólipos adenomatosos e adenocarcinomas do colo, foram descritos no Capítulo 55 (ver Figura 55–10 e Tabela 55–9). O leitor é aconselhado a ler a seção apropriada naquele Capítulo.

A utilização de marcadores tumorais no manejo do câncer foi discutida no Capítulo 55. O CEA foi um dos marcadores tumorais descritos (ver **Tabela 55–15**). Ele é uma glicoproteína presente nas membranas plasmáticas de muitas células, sendo liberado no plasma em diversas condições, nas quais pode ser medido por radioimunoensaio. Os níveis de CEA estão aumentados no soro no câncer colorretal, mas também em outros cânceres do tubo digestório ou fora dele, e em certas condições não cancerosas.

Menos de 50% dos indivíduos com câncer colorretal localizado apresentam níveis elevados de CEA, portanto, ele **não é útil como teste de triagem** para essa condição. Sua principal utilização é na **monitoração dos efeitos do tratamento** e na detecção da **recorrência** de cânceres, tais como o câncer colorretal, pelo acompanhamento das alterações dos seus níveis. No presente caso, o nível do CEA permaneceu baixo por cinco anos após a cirurgia, sugerindo que não houve recorrência do câncer. O objetivo (provavelmente inatingível) da pesquisa nessa área seria o desenvolvimento de biomarcadores altamente específicos para o câncer colorretal inicial e outros cânceres muito iniciais, que seriam positivos em 100% dos casos e negativos em 100% dos indivíduos normais.

A **Figura 57-6** resume alguns dos principais fatores que levam ao desenvolvimento do câncer colorretal.

CASO 5: FIBROSE CÍSTICA (FC)

Etiologia

Genética (mutações no gene que codifica a proteína reguladora transmembrana da fibrose cística [CFTR]).

História e exame físico

Uma menina de um ano de idade, filha única de um casal caucasiano, foi levada ao ambulatório do Hospital para Crianças Doentes por sua mãe. Ela esteve febril nas últimas 24 horas e tossia frequentemente. A mãe relatou que sua filha já havia apresentado três crises de "bronquite" desde o nascimento, que foram tratadas com antibióticos por seu médico de família. A mãe também notou que sua filha apresentava fezes um pouco volumosas e com odor fétido nos últimos meses e que não estava ganhando peso como o esperado. Em função da história de problemas pulmonares e gastrintestinais, o médico assistente suspeitou de que a paciente poderia ter FC, embora não fosse evidenciada história familiar para essa condição.

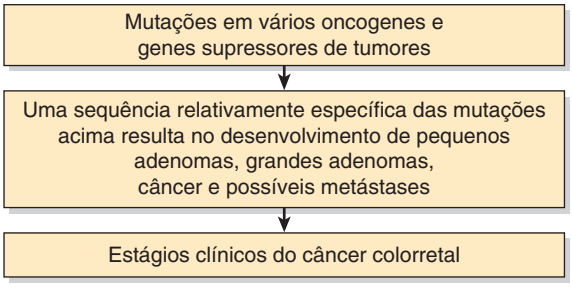


FIGURA 57-6 Esquema simplificado da etiologia em várias etapas do câncer colorretal.

Achados laboratoriais

A radiografia de tórax mostrou sinais compatíveis com broncopneumonia. A cultura do escarro revelou a predominância de *Pseudomonas aeruginosa*. A gordura fecal estava aumentada. Foi realizado o *teste do suor* por meio da *iontoforese quantitativa* pela *pilocarpina, e o* Cl^- *no suor era de 70 mmol/L (>60 mmol/L é considerado anormal); o teste foi repetido uma semana mais tarde com resultados semelhantes.*

Tratamento

Foi administrado antibiótico adequado à criança, a qual foi encaminhada a uma **clínica de fibrose cística** para cuidados adicionais. Um **amplo programa** foi instituído para cuidar de todos os aspectos da saúde, incluindo considerações psicossociais. Ela iniciou o tratamento com uma **preparação de enzima pancreática** (oferecida a cada refeição) e foi submetida a uma **dieta hipercalórica** suplementada com **polivitaminas** e **vitamina E**. Foi feita **drenagem postural** para as secreções pulmonares espessas. Infecções subsequentes foram tratadas prontamente com antibióticos adequados e com uma preparação de **DNase humana** recombinante em aerossol, que digere o DNA de microrganismos presentes no trato respiratório. Com seis anos de idade, ela já havia crescido normalmente, e estava praticamente livre de infecção há um ano, frequentando a escola e com progressos satisfatórios. Casos crônicos graves de FC, em que os pulmões são severamente comprometidos, são candidatos para **transplantes de pulmão**, embora a eficácia desse tratamento tenha sido contestada recentemente.

A pesquisa com **terapia gênica** para FC está em andamento (p. ex., pelo uso de vírus recombinantes que codificam a proteína CFTR). Outra linha de pesquisa está investigando se **moléculas pequenas** podem ter utilidade clínica no auxílio às moléculas de CFTR dobradas anormalmente a se dobrarem de novo de modo a se tornarem, pelo menos, moléculas parcialmente ativas.

Discussão

A FC é uma doença genética geralmente grave e **prevalente** entre pessoas brancas da América do Norte. Ela afeta aproximadamente 1:2500 indivíduos e é herdada como doença **autossômica recessiva**; pelo menos 1 pessoa em 25 é portadora. É uma doença das **glândulas exócrinas**, sendo os **tratos respiratórios e gastrintestinais** os mais afetados. Uma característica diagnóstica é a presença de **grandes quantidades de NaCl no suor**, que reflete uma anormalidade subjacente no funcionamento da glândula exócrina (ver adiante). A **iontoforese pela pilocarpina** tem geralmente sido usada para coletar quantidades suficientes de suor para a análise. A iontoforese é um processo pelo qual drogas são introduzidas no corpo (nesse caso, a pele) por intermédio de uma

corrente elétrica. Sua utilização vem diminuindo à medida que a disponibilidade de sondas genéticas específicas aumenta.

A **apresentação clássica** da FC é a de uma criança pequena com uma história recorrente de infecção pulmonar e sinais de insuficiência exócrina (p. ex., fezes volumosas e gordurosas devido à ausência da lipase pancreática), como no presente caso. Entretanto, a doença é **clinicamente heterogênea**, o que, pelo menos, reflete parcialmente a heterogeneidade no nível molecular (ver adiante). Aproximadamente 15% dos pacientes podem ter função pancreática suficiente para serem classificados de "suficientes pancreáticos".

Pelas razões relacionadas a anormalidades no transporte de Cl^- e Na^+ (ver adiante), os **dutos pancreáticos** e os dutos de outras glândulas exócrinas se enchem de um **muco viscoso**, o que leva à sua **obstrução**. Esse muco também está presente nos **bronquíolos**, levando à sua obstrução; isto favorece o crescimento de certas bactérias (p. ex., *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) que provocam **infecções broncopulmonares recorrentes**, que eventualmente comprometem seriamente a função pulmonar. Por sua vez, a doença pulmonar pode levar à hipertrofia ventricular direita e possível insuficiência cardíaca. Os pacientes geralmente morrem de **infecção respiratória** ou **insuficiência cardíaca**. Recentemente, mais pacientes têm vivido até os 30 anos ou mais, visto que a condição atualmente é diagnosticada mais cedo e a terapia global adequada é iniciada. Algumas vezes, problemas causados pela ausência de secreção pancreática podem estar presentes **no nascimento**, os recém-nascidos apresentam obstrução intestinal devido ao mecônio muito espesso (**íleo meconial**). Outros pacientes, afetados menos gravemente, podem não ser diagnosticados até a adolescência ou mais tarde. A FC também afeta o **trato genital** e a maioria dos homens e mulheres são **inférteis**.

Em 1989, os resultados de um programa de colaboração entre cientistas canadenses e americanos revelaram a natureza da lesão genética da maioria dos pacientes com FC. O gene envolvido na FC foi o primeiro a ser clonado unicamente a partir da sua posição determinada por **análise de ligação** (**clonagem posicional**), representando uma enorme quantidade de trabalho árduo e um tremendo triunfo para a "**genética reversa**". A genética reversa significa que o **gene foi isolado com base na sua localização no mapa**, e não a partir da disponibilidade de rearranjos ou deleções cromossomais (em contrapartida, por exemplo, com o isolamento do gene envolvido na distrofia muscular de Duchenne). O sucesso desse esforço hercúleo mostrou que, pelo menos na teoria, a base molecular de qualquer doença genética pode ser revelada por abordagens semelhantes. Avanços mais recentes (p. ex., os resultados do Projeto Genoma Humano) têm facilitado ainda mais a identificação de "genes de doenças".

A **Tabela 57-2** resume as principais estratégias utilizadas na detecção do gene envolvido na causa da FC. O produto proteico do gene codifica uma proteína da membrana integral de aproximadamente 170 kDa. Ela foi chamada de **CFTR** e é um **transportador de cloreto responsivo ao AMPc**, ajudando a explicar o elevado conteúdo de cloreto encontrado no suor de pacientes com FC.

Algumas das características do **gene** e da proteína **CFTR** são listadas na **Tabela 57-3**. A principal mutação inicialmente localizada no gene era a deleção de três bases que codificam o resíduo 508 da fenilalanina (ΔF508); na América do Norte, aproximadamente 70% dos portadores de FC apresentam essa mutação. Trabalhos subsequentes têm revelado **mais de 1.000 mutações diferentes** no gene. Vários tipos diferentes de mutações foram encontrados, incluindo pequenas deleções, inserções e mutações de troca (*missense*) e sem sentido (*nonsense*). Devido à importância do diagnóstico precoce, em alguns países, **todos os recém-nascidos** são, atualmente, rastreados geneticamente para FC. Em outros lugares, técnicas para detectar a deleção de ΔF508 e de várias outras mutações mais frequentes estão sendo usadas para **confirmar o diagnóstico** de FC, para **detectar os portadores** e no **diagnóstico pré-natal**.

TABELA 57-2 Algumas estratégias usadas para isolar o gene envolvido na FC

• A partir do estudo de um grande número de famílias com FC, a atribuição da doença ao cromossomo 7 foi feita demonstrando a ligação a vários RFLPs naquele cromossomo.
• A limitação adicional a uma região menor do cromossomo 7 foi conseguida com o uso de RFLPs adicionais.
• O *chromosome jumping* e a *chromosome walking* foram usados para isolar clones.
• A região afetada foi sequenciada ao se buscar por mutações no DNA que não estavam presentes no DNA de indivíduos normais, por éxons expressos como mRNA em tecidos afetados por FC (p. ex., pâncreas e pulmões), por sequências conservadas entre espécies e por um quadro de leitura aberta (indicando uma proteína expressa).

A **proteína CFTR** (**Figura 57-7**) é composta por duas metades semelhantes, cada uma contendo seis regiões transmembrana e uma dobra de ligação (NBF) ao nucleotídeo (ATP). As duas metades da molécula são unidas por um domínio regulador. O F508 está localizado na NBF1. A proteína exibe semelhanças na estrutura com algumas outras proteínas que utilizam o ATP para transportar moléculas pelas membranas celulares (p. ex., P-glicoproteína, envolvida na resistência a certos agentes quimioterápicos do câncer).

Normalmente, a CFTR é sintetizada em polirribossomos ligados e exportada para a membrana plasmática, onde atua. Mutações podem afetar a CFTR de vários modos, os quais são

TABELA 57-3 Algumas características do gene para a proteína CFTR e da própria proteína

• Um gene de cerca de 250.000 pb no cromossomo 7.
• 25 éxons.
• mRNA de 6.129 pb.
• Proteína transmembrana de 1.480 aminoácidos.
• A CFTR contém duas NBFs e um domínio regulatório.
• A mutação mais comum na FC é a deleção de ΔF508 presente no primeiro NBF.
• A CFTR é uma transportadora de cloreto responsiva a AMPc.
• Apresenta homologia com outras proteínas que usam ATP para afetar o transporte através de membranas (p. ex., P-glicoproteína).

Abreviações: CFTR, proteína regulatória transmembrana da fibrose cística; F, fenilalanina; NBF, dobra de ligação ao nucleotídeo.

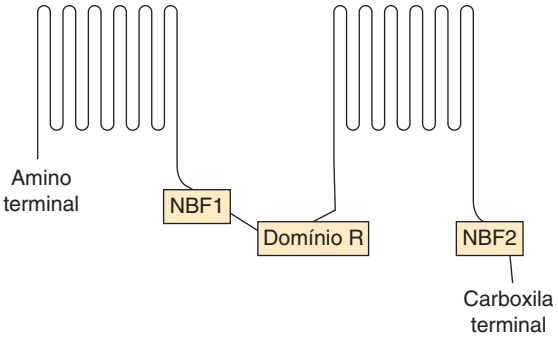


FIGURA 57-7 Diagrama da estrutura da proteína CFTR (não em escala). A proteína contém 12 segmentos transmembrana, duas dobras ou domínios de ligação a nucleotídeos (NBF1 e NBF2) e um domínio regulatório (R). NBF1 e NBF2 se ligam ao ATP e acoplam sua hidrólise ao transporte de Cl^-; elas são chamadas de cassetes de ligação ao ATP (ABCs), uma característica encontrada em vários transportadores de membrana. A Phe 508, o principal *locus* das mutações na FC, está localizado na NBF1.

resumidos brevemente na **Tabela 57-4**. Muitas mutações afetam o dobramento da proteína, reduzindo acentuadamente a sua função; isto classifica a FC como uma **doença conformacional** ou uma doença devido a uma deficiência na proteoestase (ver Capítulo 46 e a discussão sobre a doença de Alzheimer neste capítulo). As mutações afetam muitas outras proteínas de modo semelhante aos resumidos na Tabela 54–4, acometendo a sua síntese, seu processamento ou sua função.

A **Figura 57-8** resume alguns dos mecanismos envolvidos na etiologia da FC.

TABELA 57-4 Alguns mecanismos pelos quais as mutações podem afetar a proteína CFTR[1]

I Reduzir ou impedir a sua síntese
II Bloquear seu processamento intracelular
III Alterar sua regulação de fluxo de cloro
IV Alterar a condutância do canal de cloro

[1]Muitos dos mecanismos acima envolvem anormalidades de dobramento da proteína CFTR, e, portanto, a FC pode ser classificada como doença conformacional ou doença causada pela deficiência de proteostase (ver Capítulo 46). Até que a terapia gênica para FC seja desenvolvida, vários cientistas estão tentando encontrar moléculas pequenas que interajam com CFTR dobradas de modo anormal e que restaurem parcialmente o seu funcionamento.

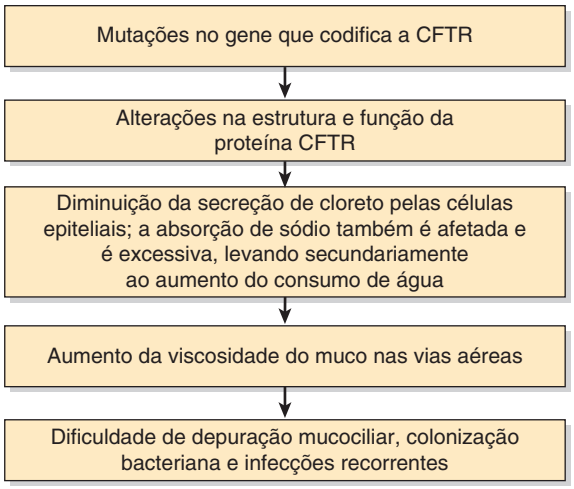


FIGURA 57-8 Resumo dos possíveis mecanismos envolvidos nas células das vias respiratórias de indivíduos com fibrose cística (OMIM 219700) que têm patologias pulmonares. Em indivíduos de origem caucasiana, 70% das mutações ocorrem em um *locus*, resultando na deleção de ΔF508 da proteína CTR. Entretanto, mais de 1.000 mutações foram identificadas no gene *CFTR*. Basicamente, a proteína CFTR atua normalmente como um transportador regulado por AMPc envolvido na secreção de Cl^-, mas, além disso, normalmente inibe a absorção de Na^+ por um canal de Na^+. A viscosidade do muco nos dutos pancreáticos também aumenta, levando à sua obstrução. Os detalhes sobre como anormalidades da CFTR afetam o transporte de íons no pâncreas são um pouco diferentes do que nos pulmões.

CASO 6: CETOACIDOSE DIABÉTICA (DKA)

Etiologia

Endócrina (devido à deficiência de insulina).

História e exame físico

Em coma, uma garota de 14 anos de idade foi admitida em um hospital infantil. Sua mãe relatou que a menina estava com boa saúde até aproximadamente duas semanas, quando apresentou dor na garganta e febre. Em seguida, ela perdeu o apetite e passou a não se sentir bem. Vários dias antes da admissão, ela começou a se queixar de sede excessiva e também começou a se levantar várias vezes durante a noite para urinar. Seu médico de família estava fora da cidade e a mãe relutou em contactar outro médico. Entretanto, no dia da admissão, a garota começou a vomitar, se tornou sonolenta e com dificuldade para despertar e, consequentemente, foi levada ao departamento de emergência. No exame físico, ela estava desidratada, sua pele estava fria, ela respirava de forma profunda e suspirosa (respiração de Kussmaul) e seu hálito tinha odor de frutas. Sua pressão arterial era de 90/60 e a frequência de seu pulso era de 115/min. Ela não podia ser acordada. Um diagnóstico de diabetes melito tipo 1 (inicialmente chamado de insulino-dependente) com cetoacidose resultante e coma (DKA) foi feito pelo médico de plantão.

Achados laboratoriais

O diagnóstico de admissão foi confirmado por achados de laboratório, gentilmente fornecidos pelo Dr. ML Halperin:

Resultados plasmáticos ou séricos (níveis normais entre parênteses, em Unidades SI):

- Glicose, 50 (4,2 a 6,1 mmol/L)
- Cetoácidos ++++ (traços)
- Bicarbonato, 6 (22 a 30 mmol/L)
- Nitrogênio da ureia, 15 (2,5 a 7,1 mmol/L)
- pH do sangue arterial, 7,07 (7,35 a 7,45)

- Na^+, 136 (136 a 146 mmol/L)
- Cl^-,100 (102 a 109 mmol/L)
- pCO_2, 2,7 (4,3 a 6,0 kPa [ou 32 a 45 mmHg])
- Ânion *gap*, 31 (7 a 16 mmol/L) (O ânion *gap* é calculado pela fórmula $Na^+ - [Cl^- + HCO_3^-]$.)
- Potássio, 5,5 (3,5 a 5,0 mmol/L)
- Creatinina, 200 (44 a 80 μmol/L)
- Albumina, 50 (41 a 53 g/L)
- Osmolalidade, 325 (275 a 295 mOsm/kg de água sérica)
- Hematócrito, 0,500 (0,354 a 0,444)

Resultados de urina:

- Glicose, ++++ (normal –)
- Cetoácidos, ++++ (normal –)

Tratamento

As medidas iniciais mais importantes no tratamento da cetoacidose diabética é a administração intravenosa de **insulina** e solução **salina**. A paciente recebeu insulina intravenosa (10 unidades/h) adicionada à solução de NaCl a 0,9%. A glicose não foi administrada até que a glicose no plasma caísse para abaixo de 15 mM. A insulina e a glicose facilitam a entrada de K^+ nas células. Uma solução de KCl também foi administrada com cuidado, com os níveis de K^+ monitorados a cada hora inicialmente. O **monitoramento contínuo dos níveis de K^+** é extremamente importante no manejo da cetoacidose diabética, pois o manejo inadequado do balanço de K^+ é a principal causa de morte. A administração de bicarbonato não é necessária rotineiramente, exceto nos casos em que a acidose é muito grave.

Discussão

A **etiologia** exata do diabetes melito tipo 1 (insulino-dependente) ainda não foi elucidada e permanece sob intensa investigação. Fatores genéticos, ambientais e imunológicos estão envolvidos. Um esquema muito provisório das cadeias de eventos é o seguinte. Pacientes com esse tipo de diabetes apresentam uma **suscetibilidade genética** (um grande número de genes, incluindo os genes de histocompatibilidade localizados no cromossomo 6, estão envolvidos), que pode predispor a uma **infecção viral** (p. ex., pelo vírus coxsackie ou rubéola). A infecção e a consequente reação inflamatória podem alteram a antigenicidade da superfície das células B pancreáticas e desencadear uma reação autoimune, que envolve os anticorpos citotóxicos e os linfócitos T. Isto leva, eventualmente, à destruição generalizada das células beta, resultando no diabetes melito tipo 1. Talvez a **dor de garganta** que a paciente apresentou várias semanas antes da admissão refletisse uma infecção viral inicial.

A **hiperglicemia** acentuada, a **glicosúria**, a **cetonemia** e a **cetonúria** confirmaram o diagnóstico de DKA. O **pH baixo** indicou uma acidose grave devido à produção muito aumentada dos ácidos acetoacético e β-hidroxibutírico. Os níveis baixos de **bicarbonato** e **pCO_2** confirmaram a presença de **acidose metabólica** com compensação respiratória parcial (a hiperventilação). O cálculo do **ânion *gap*** é útil em várias situações metabólicas. Nesse caso, ele está elevado devido à presença de cetoácidos em excesso no sangue. Há várias outras causas de elevação do ânion *gap*, incluindo a acidose lática e a intoxicação por metanol, etileno glicol e salicilatos.

Os valores elevados de **ureia e creatinina** indicaram alguma insuficiência renal (devido à perfusão renal diminuída em consequência do baixo volume sanguíneo secundário à desidratação), desidratação e aumento da degradação de proteínas. Um nível plasmático elevado de **potássio** é frequentemente encontrado em DKA devido a uma absorção diminuída de potássio pelas células na ausência de insulina. Portanto, o quadro clínico de DKA reflete as anormalidades no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas que ocorrem quando os níveis plasmáticos de insulina são reduzidos drasticamente. O aumento da **osmolalidade** do plasma devido à hiperglicemia também contribui para o desenvolvimento de coma na cetoacidose diabética. Deve ser evidente que o tratamento racional de um paciente com DKA depende de uma familiaridade completa com as ações da insulina.

Um esquema geral dos eventos que ocorrem na DKA é mostrado na **Figura 57-9**.

CASO 7: DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE (DMD)

Etiologia

Genética (mutações no gene que codifica a proteína distrofina).

História e exame físico

Um menino de quatro anos de idade foi levado para o ambulatório de um hospital infantil. Sua mãe estava preocupada porque tinha notado que seu filho estava andando desajeitadamente, caía com frequência e apresentava dificuldade ao subir escadas. Ele não tinha irmãos, mas a sua mãe tinha um irmão que havia morrido com 19 anos de distrofia muscular. O pediatra de plantão observou fraqueza muscular tanto na cintura pélvica quanto na escapular. Aumento discreto dos músculos da panturrilha também foi observado. Devido à fraqueza muscular e sua distribuição, o pediatra fez um diagnóstico provisório de DMD.

Achados laboratoriais e outros achados

A atividade no soro da **creatina-quinase** (CK) estava acentuadamente elevada. Ele decidiu proceder diretamente à **análise da mutação** utilizando uma amostra de linfócitos do paciente. Ela mostrou uma grande deleção no gene para distrofina, confirmando o diagnóstico de DMD. Isso evitou que o paciente fosse submetido à eletromiografia e à biópsia muscular; esses testes, junto ao *Western blot* para detecção da distrofina, eram rotineiramente realizados antes da disponibilidade da análise da mutação, e ainda podem ser realizados em alguns casos.

Discussão

A história familiar, a distribuição característica da fraqueza muscular, a elevação da CK no soro, e o resultado da análise da mutação confirmaram o diagnóstico provisório de DMD. Esta é uma doença muscular degenerativa grave **ligada ao X** que pos-

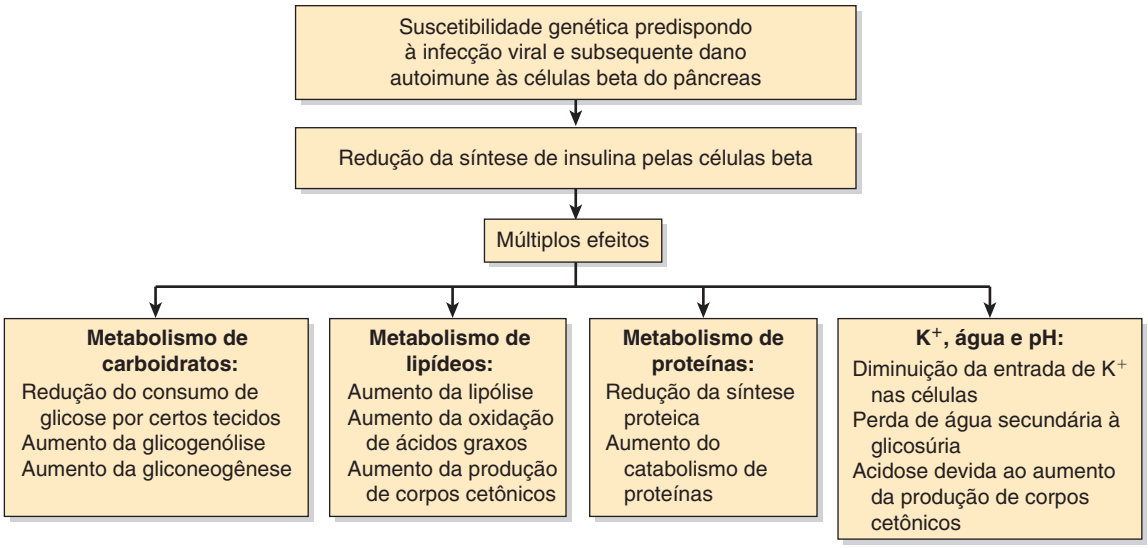


FIGURA 57-9 Resumo de alguns dos mecanismos envolvidos na etiologia da cetoacidose do diabetes melito tipo I (OMIM 222100).

sui uma prevalência de aproximadamente 1:3500 nascimentos vivos. Ela afeta **meninos jovens**, que inicialmente apresentam perda de força em seus músculos proximais, levando a um andar bamboleante, dificuldade de ficar em pé e, eventualmente, fraqueza muito grave. A morte geralmente ocorre por insuficiência respiratória.

A **causa da DMD** foi revelada entre 1986 e 1987. Vários estudos levaram à localização do defeito no meio do braço curto do cromossomo X e à identificação subsequente do segmento do DNA que foi **deletado** em pacientes com DMD. Utilizando-se o segmento correspondente, o não deletado, de indivíduos normais, um DNAc foi isolado, derivado pela transcriptase reversa de um transcrito (mRNA) de 14 kb, que era expresso no músculo esquelético de fetos e adultos. Ele foi clonado e o produto proteico identificado como **distrofina**, uma proteína em forma de bastão de 400 kDa com 3.685 aminoácidos. A distrofina estava ausente ou muito diminuída nos eletroforetogramas de extratos de músculos de pacientes com DMD e de camundongos com uma distrofia muscular ligada ao X. Anticorpos contra distrofina foram utilizados para estudar sua localização no músculo; ela está associada ao **sarcolema** (membrana plasmática) do músculo normal e está ausente ou muito reduzida em pacientes com DMD. Uma redução menos grave na quantidade de distrofina, ou uma redução em seu tamanho, é a causa da **distrofia muscular de Becker**, um tipo mais leve de distrofia muscular. Enquanto as **deleções** e **duplicações** de genes tendem a causar mutações de fase de leitura (*frameshift*), os mesmos tipos de mutações na DM de Becker são em geral *in frame* e, portanto, a síntese de distrofina não é afetada nessa última.

A **distrofina** parece possuir quatro domínios, dois dos quais são semelhantes aos domínios presentes na α-actinina (outra proteína muscular) e um ao domínio na espectrina, uma proteína do citoesqueleto de células vermelhas do sangue. Como mostrado na Figura 49–11, a distrofina interage com a actina, sintrofina e β-distroglicano. Sua **função** não é clara, mas ela pode ser importante na sinalização transmembrana e na estabilização do citoesqueleto e sarcolema.

A deficiência de distrofina pode afetar a integridade do sarcolema, resultando em um aumento da fragilidade osmótica do músculo distrófico ou permitindo um influxo excessivo de Ca^{2+}. O **gene** que codifica a distrofina é o maior gene humano reconhecido atualmente (aproximadamente 2.500 kb, 79 éxons), o que ajuda a explicar a observação de que aproximadamente um terço dos casos de DMD é de novas mutações. Tentativas têm sido feitas para **produzir a distrofina** pela tecnologia do DNA recombinante e, talvez, eventualmente, administrá-la aos pacientes. A disponibilidade de **sondas** para a distrofina facilita o **diagnóstico pré-natal** de DMD por meio da biópsia de vilosidades coriônicas ou amniocentese. A demonstração da ausência de distrofina como uma causa de DMD foi uma das principais realizações da aplicação da biologia molecular ao estudo de doenças humanas.

Há muitos **tipos diferentes** de distrofia muscular. As causas moleculares de muitas delas foram elucidadas. Não surpreendentemente, talvez, elas se devem a várias mutações em genes que codificam proteínas musculares específicas, como as mostradas na Figura 49–11 e outras não mostradas. As várias distrofias musculares podem ser classificadas com base em suas características clínicas (p. ex., a cintura de membros, etc.), ou, progressivamente, com base nos genes ou proteínas afetados pelas mutações causadoras. A distrofina também ocorre no músculo cardíaco e no cérebro. Sua ocorrência no primeiro pode resultar em **miocardiopatia**. A ausência de distrofina no **cérebro** resulta em QI inferior a 75, que é observado em cerca de 25% dos meninos com DMD.

Tratamento

Atualmente, não há terapia específica para DMD. O tratamento, nesse caso, foi, portanto, essencialmente **sintomático**. O paciente foi inscrito em uma **clínica especial de distrofia muscular**, começou a tomar **prednisona** (que pode retardar o progresso de DMD por alguns anos) e foi encorajado a praticar **exercícios** leves. Um **fisioterapeuta** estava disponível quando necessário.

Respiradores portáteis se mostraram muito úteis quando a respiração foi afetada. A mãe foi orientada a procurar **aconselhamento** genético pensando-se em futuras gestações. Em diferentes momentos, várias medidas terapêuticas destinadas a beneficiar pacientes com DMD têm sido utilizadas. Elas incluem a utilização da transferência de mioblastos (para fornecer distrofina), oligonucleotídeos *antisense* (para pular os éxons do gene mutante para a distrofina), CoE Q10 (para possivelmente aumentar a força muscular), monoidrato de creatina (para talvez ajudar a construir massa muscular), pentoxifilina (anti-inflamatório), e gentamicina (pode ignorar códons de parada prematura no gene da distrofina). Nenhuma parece ter sido muito bem-sucedida. Um pequeno estudo utilizando a transferência de genes da distrofina estava programado para começar nos Estados Unidos em janeiro de 2008.

A **Figura 57-10** resume os mecanismos envolvidos na etiologia de DMD.

CASO 8: INTOXICAÇÃO AGUDA POR ETANOL

Etiologia

Química (devido ao consumo excessivo de etanol).

História e exame físico

Em coma, um homem de 52 anos de idade foi admitido no departamento de emergência. Aparentemente, ele tinha se tornado muito deprimido após a morte da esposa um mês antes. Antes da morte da esposa, ele bebia moderadamente, mas seu consumo de álcool aumentou acentuadamente nas últimas semanas. Ele também vinha se alimentando mal. Sua filha casada apareceu para vê-lo no domingo pela manhã e o encontrou inconsciente no sofá da sala de visitas. Duas garrafas vazias de *uísque* foram encontradas na mesa da sala de estar. No exame, ele não podia ser acordado, sua respiração era profunda e ruidosa, o cheiro de álcool podia ser sentido no seu hálito e sua temperatura era de 35,5°C (a normal é de 36,3 a 37,1°C). O diagnóstico na admissão foi de coma por ingestão excessiva de álcool.

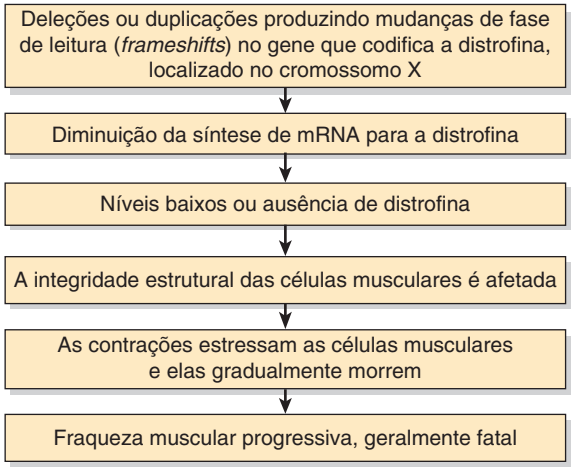


FIGURA 57-10 Resumo dos mecanismos envolvidos na etiologia da distrofia muscular de Duchenne (OMIM 310200).

Achados laboratoriais

Os resultados laboratoriais pertinentes foram álcool de 500 mg/dL, glicose de 2,7 mmol/L (normal: 4,2 a 6,1), lactato de 8,0 mmol/L (normal: 0,5 a 1,6) e pH sanguíneo de 7,21 (normal: 7,35 a 7,45).

Esses resultados eram consistentes com o diagnóstico de admissão, acompanhados por uma acidose metabólica.

Tratamento

Foi administrada uma solução salina normal intravenosa e, em seguida, devido ao nível muito elevado de álcool no sangue e ao coma, foi decidido iniciar a **hemodiálise** imediatamente. Esse processo elimina diretamente o etanol tóxico do corpo, mas só é necessário em casos muito graves de intoxicação pelo etanol. Nesse caso, o nível de álcool no sangue caiu rapidamente e o paciente recuperou a consciência, mais tarde, no mesmo dia. Uma solução de **glicose** (5%) intravenosa foi administrada após a diálise para corrigir a hipoglicemia que o paciente apresentava. O paciente se recuperou bem e foi encaminhado para um **aconselhamento psiquiátrico**.

Discussão

O consumo excessivo de álcool é um importante problema de saúde na maioria das sociedades. O presente caso trata dos efeitos agudos e tóxicos de uma grande ingestão de etanol. Um problema relacionado, não discutido aqui, mas com muitos aspectos bioquímicos, é o desenvolvimento de **cirrose hepática** em indivíduos que mantêm um grande consumo de etanol (p. ex., 80 g de etanol absoluto por dia por mais de 10 anos).

De um ponto de vista bioquímico, a principal questão envolvida no presente caso é como o etanol produz seus efeitos agudos diversos, incluindo o coma, a acidose lática e a hipoglicemia. O ponto de vista clínico é como tratar melhor essa condição.

O **metabolismo do etanol** foi descrito no Capítulo 25. Ele ocorre principalmente no fígado e envolve duas vias. A primeira e principal via utiliza a **álcool desidrogenase** e a **acetaldeído desidrogenase**, que convertem o etanol, por meio do acetaldeído em acetato (Capítulo 25), que é, então, convertido em acetil-CoA. O NADH e o H^+ são produzidos em ambas as reações. A **relação** intracelular de **NADH/NAD**$^+$ pode, assim, aumentar consideravelmente por meio da ingestão de grandes quantidades de álcool. Esta, por sua vez, pode afetar o Keq de várias reações metabólicas importantes que utilizam esses dois cofatores. Níveis elevados de NADH favorecem a **formação de lactato** a partir do piruvato, provocando a acidose lática. Isto diminui a concentração de piruvato (necessária para a reação da **piruvato-carboxilase**, Capítulo 17) e, portanto, **inibe a gliconeogênese**. Em casos graves, quando o glicogênio hepático se esgota e não está mais disponível para a glicogenólise, a **hipoglicemia** ocorre. A segunda via envolve um **citocromo P450 microssomal** (sistema de oxidação do etanol microssomal), que também produz acetaldeído (Capítulo 25). O **acetaldeído** é uma molécula altamente reativa e pode formar adutos com proteínas, ácidos nucleicos e outras moléculas. Parece

provável que sua capacidade de agir com várias moléculas esteja envolvida na etiologia dos efeitos tóxicos do etanol. Além dos estudos metabólicos mencionados, estudos recentes sugerem que muitos dos efeitos produzidos pelo etanol na intoxicação aguda são devidos a **lipídeos que desordenam** da membrana celular de **neurônios**. Estudos mais recentes têm focado em **proteínas**, particularmente **receptores** e **canais iônicos** (ver Capítulos 40 e 41), que desempenham importantes papéis na função normal de neurônios e outras células. Vários estudos têm revelado que o etanol **inibe** ou, em alguns casos, **ativa** vários receptores e canais iônicos. Estes incluem os receptores GABA (ácido γ-amino-butírico), nicotínicos, acetilcolina, glutamato, e NMDA (*N*-metil-D- aspartato), e vários canais de K^+ e Ca^{2+}. Alterações das atividades dos receptores podem afetar as vias de sinalização intracelular, contribuindo para os efeitos do etanol. Um modo pelo qual o etanol pode perturbar as funções dessas proteínas é pela **substituição de moléculas de água** em vários sítios críticos. Pesquisas adicionais poderão ajudar a explicar os efeitos agudos do etanol na condição mental. A **Figura 57-11** resume alguns dos principais mecanismos envolvidos na etiologia da toxicidade pelo etanol.

CASO 9: GOTA AGUDA

Antes de estudar este caso, aconselha-se o leitor a consultar o material no Capítulo 33 que trata do ácido úrico.

Etiologia

Deposição de cristais de urato monossódico (MSU) em uma ou mais articulações e em vários tecidos. A grande maioria dos casos (aproximadamente 90%) está associada à **diminuição da excreção renal de MSU**, mas, em certos casos, o aumento da **produção de MSU** está envolvido e o **consumo dietético aumentado de purinas** pode desempenhar algum papel importante.

História e exame físico

Um homem de 64 anos de idade, moderadamente obeso, chegou ao departamento de emergência queixando-se de dor severa, de 12 horas de duração, no "dedão" do pé esquerdo. Ele relatou que bebia regularmente, pelo menos duas ou três doses de uísque escocês toda noite após o trabalho. Ele não apresentava qualquer outra história médica significativa. No exame físico, o dedão do pé esquerdo encontrava-se vermelho e muito inchado ao redor da articulação metacarpofalangeana e extremamente sensível. Não havia sinais de artrite em outros locais. Devido à história e à localização da articulação afetada, a médica de plantão suspeitou de que o paciente apresentava um quadro de gota aguda. Ela solicitou vários testes laboratoriais, incluindo a contagem de células brancas, a determinação do ácido úrico e uma radiografia da articulação afetada. O nível sérico de ácido úrico era de 0,61 mmol/L (o normal é de 0,18 a 0,41 mmol/L em homens); a contagem de células brancas estava no valor limite para o normal. Os achados radiográficos não eram específicos; não havia sinais evidentes de artrite crônica. Com anestesia local, foi realizada uma artrocentese da articulação afetada, e uma pequena quantidade de líquido sinovial foi retirada e enviada para o laboratório para a detecção de células e cristais. Cristais característicos de MSU, em forma de agulha, mostrando birrefringência negativa, foram detectados no líquido sinovial, bem como neutrófilos.

Tratamento

Foi administrada ao paciente uma dose de **fármaco anti-inflamatório não esteroidal** adequado (NSAID) para aliviar a inflamação aguda e a dor. Ele foi encaminhado para uma reumatologista

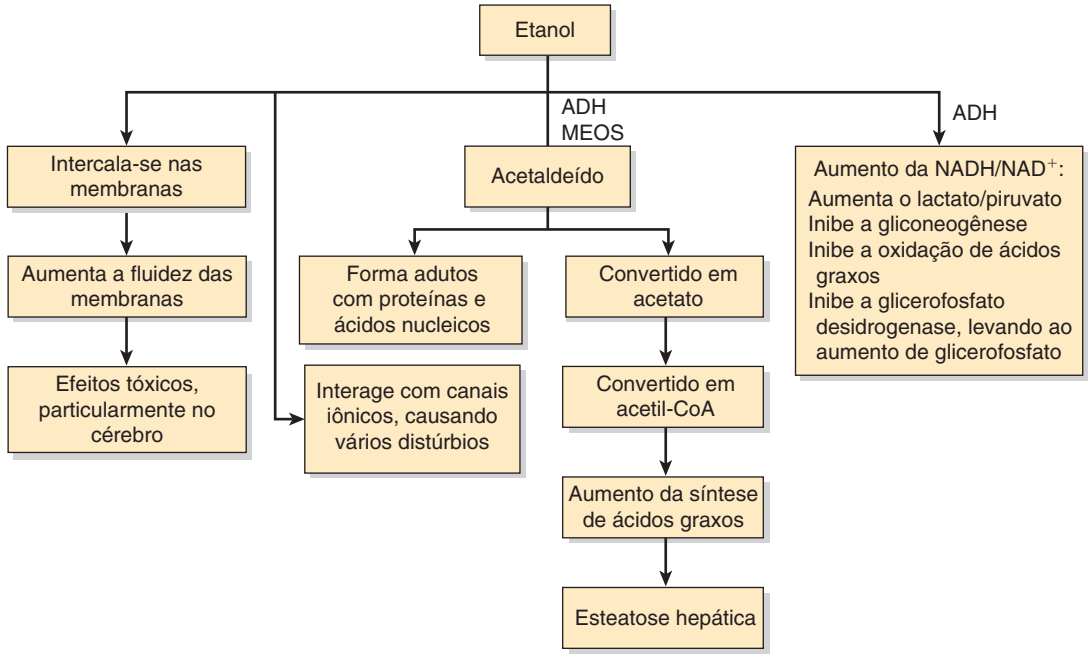


FIGURA 57-11 Resumo de alguns dos mecanismos envolvidos na toxicidade aguda por etanol. (ADH, álcool desidrogenase; MEOS, sistema de oxidação microssomal de etanol, envolvendo citocromos P450 do tipo CYP2E1.)

para continuar o tratamento; ela continua com a administração de NSAID. Vários meses após, ele apresentou outro ataque de dor aguda na articulação, dessa vez no seu joelho direito. Seu nível plasmático de ácido úrico era de 0,57 mmol/L. A **excreção diária de ácido úrico** foi medida e era em torno de 9,0 mmol/L (aproximadamente 1.500 mg) (o normal é de 3,6 a 5,4 mmol/d). A reumatologista decidiu iniciar uma terapia de longo prazo com **alopurinol**, medicamento utilizado para diminuir a formação de ácido úrico por meio da inibição da xantina oxidase, a enzima responsável pela formação de ácido úrico a partir da xantina (ver Capítulo 33). Além disso, o paciente foi encaminhado para um nutricionista para perder peso, aconselhado a beber muitos líquidos, a diminuir drasticamente a ingestão de álcool, a restringir o consumo de alimentos ricos em purinas (p. ex., anchovas e carne vermelha) e a iniciar um programa regular de exercícios. Até o presente, o paciente não teve outros ataques de artrite aguda.

Discussão

O **ácido úrico** é formado a partir dos nucleosídeos de purina (p. ex., adenosina e guanosina) produzidos pela quebra de ácidos nucleicos e outras moléculas (p. ex., ATP) e, em humanos, é o **produto final do catabolismo das purinas**. A taxa de síntese diária é estimada em 1,8 mmol (aproximadamente 300 mg) com um conjunto corporal total de aproximadamente 7,2 mmol (1.200 mg em adultos masculinos e cerca de metade desse valor para mulheres). Em indivíduos com gota, o conjunto corporal total pode ser tão elevado quanto 180 mmol (30.000 mg).

A enzima envolvida na formação do ácido úrico é a **xantina-oxidase** (ver Capítulo 33). Humanos não possuem a enzima peroxissomal uricase (urato-oxidase) que está envolvida na degradação do ácido úrico em alantoína. A uricase é atualmente disponível como um medicamento para ajudar a diminuir os níveis de ácido úrico. Aproximadamente 70% do ácido úrico são excretados pelos rins, e o restante, pelo intestino. O ácido úrico exibe **propriedades antioxidantes** (ver Capítulo 45); o possível significado deste achado está sob investigação.

A **gota** é um tipo de **artrite**, aguda ou crônica, devido à deposição de cristais de MSU, em geral, em áreas relativamente não vascularizadas, tais como as cartilagens e os tecidos em volta das articulações e também onde a temperatura corporal é mais baixa (p. ex., nas orelhas, nas partes distais dos membros). Quando os cristais de MSU são depositados no líquido sinovial, eles provocam **uma reação inflamatória**. Na gota aguda, ela consiste, principalmente, em neutrófilos. A reação inflamatória provoca os sinais e sintomas característicos de calor, dor, edema e vermelhidão que acometem a gota aguda. Em geral, é importante averiguar se os **cristais característicos** de MSU estão, de fato, presentes no líquido sinovial de uma articulação afetada, uma vez que outros cristais (p. ex., pirofosfato de cálcio) podem causar sinais e sintomas semelhantes à gota. Uma articulação é, com frequência, afetada inicialmente (i.e., artrite monoarticular), muitas vezes a articulação metacarpofalangeana do dedão do pé, como nesse caso. Um fator que ajuda a explicar essa ocorrência é que as temperaturas nas articulações das extremidades inferiores são mais baixas do que em qualquer outro local do corpo.

O MSU tem um valor de **solubilidade** no plasma de aproximadamente 0,42 mmol/L a 37°C. Ele é muito mais solúvel do que o ácido úrico, que são as espécies iônicas principais abaixo do pH de 5,75 (o valor de pKa para a dissociação do ácido úrico em urato). Essa diferença é particularmente importante na **urina**, na qual os **cálculos** de ácido úrico podem se formar em valores ácidos de pH. Quando a concentração acima é excedida, o plasma é **supersaturado** de MSU. A concentração em que a precipitação de MSU ocorre, nos tecidos e nas articulações, parece variar por razões desconhecidas. Antes de tratamentos estarem disponíveis para a prevenção da gota crônica (p. ex., halopurinol, ver adiante), grandes agregados de MSU podiam se acumular em vários tecidos, chamados de **tofos**, e podiam atingir um tamanho considerável. Os tofos ainda podem ocorrer se a gota não for diagnosticada e tratada precocemente.

A gota é geralmente precedida e acompanhada pela **hiperuricemia** (nível plasmático de ácido úrico $>$ 0,41 mmol/L). A sequência mostrada na **Figura 57-12** está frequentemente envolvida. A gota crônica pode ser prevenida se o tratamento adequado for instituído após um ataque de gota aguda. A hiperuricemia é mais comum em **homens**, embora sua incidência em mulheres aumente após a menopausa. Deve-se notar que aproximadamente 30% das pessoas que apresentam uma crise de gota podem ter níveis normais de MSU no plasma. A **hiperuricemia** é causada por uma diminuição da excreção renal, produção aumentada ou aumento do consumo de ácido úrico. A **redução da excreção renal** está envolvida na grande maioria dos casos de gota, e fatores genéticos estão provavelmente envolvidos. Muitas doenças renais afetam a excreção renal, como a acidose causada por várias condições metabólicas. Vários **medicamentos** (p. ex., alguns diuréticos e, também, os salicilatos) interferem na excreção de ácido úrico. O manejo de MSU pelos rins é complexo, incluindo as fases de filtração glomerular, reabsorção, secreção e reabsorção adicional em várias partes do túbulo renal. As contribuições precisas de alterações dessas fases para a etiologia da hiperuricemia ainda não foram claramente definidas. A **produção aumentada** pode ocorrer devido a anormalidades de algumas enzimas (p. ex., deficiência de hipoxantina-guanina fosforibosil transferase [HGPRT] e atividade aumentada de PRPP sintetase), embora não sejam comuns (ver Capítulo 33). Na síndrome de Lesch–Nyhan, mutações do gene que codifica HGPRT estão envolvidas (ver Capítulo 33), e a gota pode ser uma das características. A **morte das células cancerosas** provocadas pela quimioterapia leva à degradação dos seus ácidos nucleicos e, portanto, ao aumento da formação de purinas. O **consumo aumentado** pode ocorrer pela ingestão de alimentos ricos em purinas, tais como pães doces e carnes, embora estes possam não ser o principal fator para a elevação do ácido úrico no soro.

O papel do **consumo de álcool** em desencadear a gota é reconhecido há tempos. A ingestão de etanol pode levar à formação de **ácido lático**, que inibe a secreção de ácido úrico. Além disso, o etanol parece **promover a quebra do ATP**, levando ao aumento da produção de purinas a partir das quais se forma o ácido úrico. A solubilidade do MSU também se reduz acentuadamente à

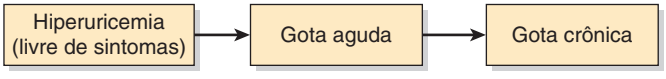


FIGURA 57-12 Uma sequência comum de eventos que levam à gota crônica.

medida que o **pH** nos tecidos cai, uma situação favorecida pelo aumento da produção de ácido lático.

Pedras renais (**cálculos de urato**) se desenvolvem frequentemente em pacientes com gota crônica; os riscos diminuem com a terapia por alopurinol.

Para o **tratamento** da dor e inflamação aguda da gota aguda, um **NSAID** é geralmente usado. A **colchicina** também é efetiva para impedir a inflamação causada pelos cristais de MSU. Ela se liga à tubulina livre, levando à despolimerização de microtúbulos (Capítulo 49); isso pode evitar a migração de neutrófilos para uma área que contenha os cristais de MSU. Entretanto, também pode causar náuseas e vômitos. Um **corticosteroide** ou **ACTH** também pode ser utilizado por seus efeitos anti-inflamatórios. Para o manejo de longo prazo, destinado a prevenir ou reverter qualquer complicação que possa surgir, o **alopurinol** é utilizado para inibir cronicamente a produção de ácido úrico a partir de xantina. A **uricase** também pode ser usada em alguns casos.

Medicamentos uricosúricos (que aumentam a taxa de excreção de ácido úrico) podem ser usados no lugar do alopurinol se estiver envolvida uma excreção diminuída de urato; eles incluem o probenicida, a sulfimpirazona e a benzobromarona. Quaisquer **condições associadas** devem ser tratadas (p. ex., obesidade, hipertensão arterial, hipertrigliceridemia, alcoolismo, doença renal). Se a gota é tratada precocemente, é compatível com um tempo de vida normal.

Um esquema simplificado da etiologia da gota aguda é mostrado na **Figura 57-13**.

CASO 10: HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA

Antes de estudar este caso, aconselha-se o leitor a consultar o material no Capítulo 50 sobre o ferro e seu metabolismo.

Etiologia

Genética (devido a mutações no gene *HFE* ou em alguns outros genes, cujos produtos proteicos afetam o metabolismo do ferro).

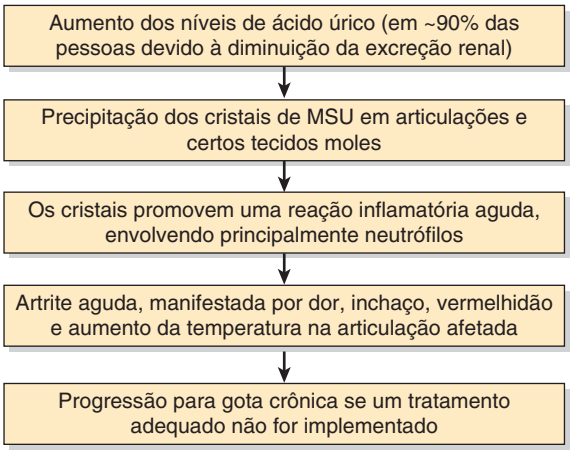


FIGURA 57-13 Esquema simplificado de alguns dos exemplos envolvidos na etiologia da gota.

História e exame físico

Um homem de 50 anos de idade procurou seu médico de família com queixas de fadiga, diminuição da libido e dores articulares generalizadas de grau moderado, com aproximadamente um ano de duração. As dores articulares eram mais nos dedos, punhos, quadris, joelhos e tornozelos. Seus pais, ambos mortos, nasceram na Escócia, mas emigraram para o Canadá no início da idade adulta. O paciente não tinha irmãos e não fumava ou bebia. Ele, ocasionalmente, tomava acetaminofem para as dores articulares, mas, afora isso, não fazia uso de qualquer medicação. Um tio havia morrido de câncer de fígado cerca de 10 anos antes. Além da rigidez e do leve inchaço de algumas articulações, o médico notou uma pigmentação acinzentada da pele, mais evidente nas partes expostas e, por essa razão, encaminhou o paciente para um especialista, que também notou que a borda do fígado era firme e palpável, logo abaixo da margem costal. O especialista suspeitou de hemocromatose hereditária e solicitou exames laboratoriais adequados, bem como radiografias das mãos, dos quadris, dos joelhos e dos tornozelos.

Achados laboratoriais

Valores de referência normais entre parênteses:

- Hb, 120 g/L (133 a 162 g/L, homens)
- Eritrócitos (RBC), 4,6 $\times$ 10^{12} /L (4,30 a 5,60 $\times$ 10^{12}/L, homens)
- Glicose (jejum), 5 mmol/L (4,2 a 6,1 mmol/L)
- Alanina aminotransferase [ALT], 1,8 μkat/L ou 105 unidades/L (0,12 a 0,70 μkat/L ou 7 a 41 unidades/L)
- Ferro plasmático, 50 μmol/L (7 a 25 μmol/L)
- Capacidade total de fixação do ferro, 55 μmol/L (45 a 73 μmol/L)
- Saturação de transferrina com o ferro 82% (16 a 35%)
- Ferritina sérica, 3.200 μg/L, (29 a 248 μg/L, homens)

As radiografias das articulações mostraram perda de cartilagem articular, estreitamento dos espaços articulares e desmineralização difusa.

Em vista dos achados acima, foi decidido realizar uma **biópsia hepática**. O exame histológico revelou moderada fibrose periportal. A hemossiderina (agregados de micelas de ferritina) era visível na forma de grânulos marrom dourados nas células do parênquima e do duto biliar epitelial; com a coloração azul da Prússia, o ferro foi muito visível nessas células. **A medição quantitativa de ferro** no material da biópsia revelou elevação acentuada de ferro (8.100 μg/g de peso seco; normal: 300 a 1.400 μg). Os achados laboratoriais e outros foram consistentes com um diagnóstico de hemocromatose hereditária.

Tratamento

O tratamento da hemocromatose hereditária é relativamente simples, consistindo na retirada de sangue do paciente até que o excesso de ferro no corpo caia para valores próximos ao normal. Isto é realizado, inicialmente, por **flebotomias** semanais, de aproximadamente 500 mL de sangue (250 mg de ferro). A eficácia do tratamento é avaliada por meio do monitoramento mensal

da ferritina sérica e da saturação de transferrina. Uma vez que esses parâmetros alcancem níveis satisfatórios, a flebotomia passa a ser realizada uma vez a cada três meses.

A **terapia de quelação** (p. ex., com deferoxamina) é raramente necessária e muito mais cara, bem como menos eficaz do que a flebotomia. Devem ser evitados alimentos ricos em ferro.

Complicações tais como cirrose hepática, diabetes melito, infertilidade e problemas cardíacos devem ser tratados adequadamente. A **triagem** de membros da família é recomendada a fim de lhes oferecer tratamento precoce, se necessário. Se a condição é reconhecida precocemente (p. ex., antes do desenvolvimento da cirrose hepática), o prognóstico é excelente. O **carcinoma hepatocelular** pode se desenvolver em pacientes com cirrose. A **artropatia** da hemocromatose não responde bem ao tratamento e pode continuar implacavelmente apesar da normalização dos parâmetros de ferro no corpo.

Discussão

Esta seção do Caso 10 foi escrita pelos Drs. Joe Varghese e Moly Jacob.

A característica principal da hemocromatose é um **aumento no ferro corporal total**, suficiente para causar danos aos tecidos. O ferro corporal total varia entre 2,5 e 3,5 g em adultos normais; na hemocromatose, ele geralmente excede 15 g. É crítico o diagnóstico precoce para prevenir complicações tais como a cirrose e o câncer hepático. A hepatomegalia, a pigmentação da pele, o diabetes melito, a doença cardíaca, a artropatia e o hipogonadismo são geralmente encontrados em casos plenamente desenvolvidos. Entretanto, é comum serem descobertos pacientes com apenas uma ou duas das características mencionadas acima. Portanto, para fazer um diagnóstico precoce, um alto índice de suspeição é necessário. **Níveis elevados de saturação de transferrina e de ferritina sérica** são os testes mais úteis para o diagnóstico precoce.

Na hemocromatose hereditária, a **absorção de ferro** a partir do intestino delgado aumenta acentuadamente. Não existem mecanismos fisiológicos que removam o excesso de ferro do corpo. O ferro livre é **tóxico** devido à sua capacidade de gerar radicais livres (Capítulo 45). O ferro acumulado causa danos a órgãos como o fígado, as ilhotas pancreáticas e o coração. A **melanina** e o ferro se acumulam na pele, sendo responsáveis pela cor cinza-ardósia geralmente observada. A causa exata do acúmulo de melanina não está clara. A coexistência frequente com o diabetes melito (devido ao dano às ilhotas pancreáticas) e a pigmentação da pele levaram ao uso do termo de **diabetes bronzeado** para essa condição.

A hemocromatose é um distúbio **autossômico recessivo**. É comum na Europa (com uma frequência de aproximadamente 1:10), particularmente na Irlanda e Escócia. Os emigrantes desses países contribuíram para a disseminação do gene afetado ao redor do mundo. Desde 1976, sabe-se que existe **uma associação** entre os antígenos HLA e a hemocromatose hereditária. Em 1996, Feder e colaboradores isolaram um gene, atualmente conhecido como *HFE*, localizado no cromossomo 6 (6p21.3) em estreita relação com os genes do complexo de histocompatibilidade principal (MHC). O produto codificado relacionava-se aos antígenos classe 1 de MHC. O *HFE* exibe **três mutações *missense*** (de troca) em indivíduos com hemocromatose hereditária. A mutação mais frequente é a que troca um resíduo de cisteinil, na posição 282, por um resíduo de tirosil (C282Y), resultando em alterações conformacionais na estrutura da proteína. A outra mutação envolve a troca de um resíduo de histidil, na posição 63, por um resíduo de aspartil (H63D). A incidência dessas duas mutações varia em grupos étnicos diferentes. O C282Y é menos frequente na Itália do que no Europa setentrional. Uma terceira mutação menos frequente (S65C) também foi encontrada, mas ainda não foi estudada detalhadamente. Um pequeno grupo de indivíduos é composto por heterozigotos (C282Y/H63D).

O **HFE** é normalmente expresso na superfície das células, ligado à **β_2-microglobulina** e à **TfR1**. A mutação C282Y inibe a formação desse complexo, resultando na diminuição da expressão da proteína HFE na superfície celular. Pensava-se, inicialmente, que a interrupção da interação HFE-TfR1 na célula da cripta intestinal era responsável pelo aumento da absorção do ferro duodenal observado na hemocromatose hereditária. Entretanto, sabe-se agora que o papel principal do HFE é na regulação da expressão da hepcidina hepática (descrita no Capítulo 50). As mutações no gene HFE são associadas a **níveis baixos de hepcidina circulante**.

A hepcidina se liga e dispara a internalização e a degradação de ferroportina, que é o exportador de ferro dos eritrócitos, macrófagos e de outras células. Portanto, níveis baixos de hepcidina **aumentam a expressão da ferroportina** na membrana basolateral dos eritrócitos. **Mutações em outros genes, além do HFE** (hepcidina, TfR2, HJV) também foram implicadas na hemocromatose hereditária, embora sejam comparativamente raras (ver Tabela 50–5). As proteínas codificadas por esses genes desempenham papéis importantes na expressão hepática de hepcidina. **Um nível baixo de hepcidina plasmática** é um achado característico nessas condições. Um provável esquema dos principais eventos na etiologia da hemocromatose hereditária é visto na **Figura 57-14**.

A **penetrância** da hemocromatose hereditária é baixa, e é menor em mulheres do que em homens. A penetrância é a fra-

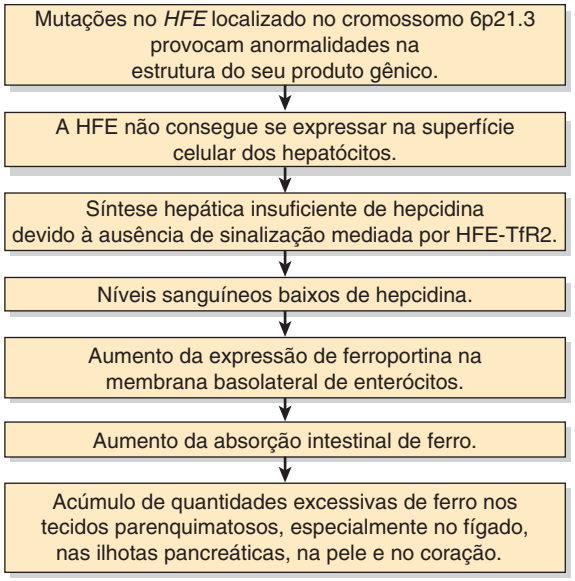


FIGURA 57-14 Provável esquema dos principais eventos na etiologia da hemocromatose hereditária (OMIM 235200). As duas principais mutações encontradas na HFE são a CY282Y e H63D. Mutações em outros genes além do *HFE* também causam hemocromatose.

ção de indivíduos com um genótipo reconhecido como causador de uma doença, que apresenta sinais e sintomas da doença. Testes genéticos têm sido desenvolvidos, mas até o presente momento não são recomendados, exceto em familiares de pacientes com hemocromatose hereditária. **Testes para mutações HFE** em indivíduos com concentrações elevadas de ferro sérico podem ser úteis.

CASO 11: HIPOTIREOIDISMO PRIMÁRIO

Antes de estudar este caso, aconselha-se o leitor a consultar o material do Capítulo 41 que trata da glândula tireoide.

Etiologia

O hipotireoidismo primário é um estado de **deficiência de hormônio da tireoide**, geralmente devido à disfunção, dano ou remoção cirúrgica da glândula tireoide. As causas específicas são discutidas a seguir.

História, exame físico e testes laboratoriais

Uma mulher de 57 anos de idade procurou seu médico de família com queixas de fadiga crônica e indolência há alguns anos; essa era sua primeira visita ao médico em cinco anos. Na anamnese, um histórico de constipação e sensação de frio (intolerância ao frio) foi revelado. Ela tinha dois filhos adultos e seu último ciclo menstrual havia ocorrido há cerca de sete anos. Uma irmã apresentava anemia perniciosa e uma tia materna tinha "um problema na tireoide".

No exame físico, a paciente estava moderadamente obesa. Ela respondia às perguntas lentamente, com pouca mudança na expressão do rosto, sua voz era grossa e sua língua ligeiramente inchada. Suas bochechas também estavam um pouco inchadas. A palpação do pescoço revelou que sua glândula tireoide apresentava uma consistência mais firme e estava um pouco aumentada. Sua pressão arterial estava levemente elevada e seus reflexos tendinosos profundos retardados. Alguns achados clínicos em um caso de hipotireoidismo estão resumidos na **Figura 57-15**. Com base na história e no exame físico sua médica suspeitou de que a paciente tinha hipotireoidismo. Ela pediu vários exames para investigar essa possibilidade. Os resultados a seguir foram os que apresentaram relevância:

- Hormônio de estimulação da tireoide (TSH): 20 mUI/L (variação normal, 0,34 a 4,25 mUI/L)
- Tireoxina (T_4), livre: 4,0 pmol/L (normal 10,3 a 21,9 pmol/L)
- Anticorpos antitireoperoxidase (anti-TPO): ++++ (normal, traços)
- Colesterol, total: 6,20 mmol/L (normal <5,17 mmol/L)
- Radiografia de tórax: revelou pequena efusão pericárdica.
- ECG: revelou bradicardia e complexos de baixa voltagem, mas sem evidência de isquemia ou arritmias.
- Hemoglobina e contagem de eritrócitos: resultados consistentes com uma anemia normocítica moderada.

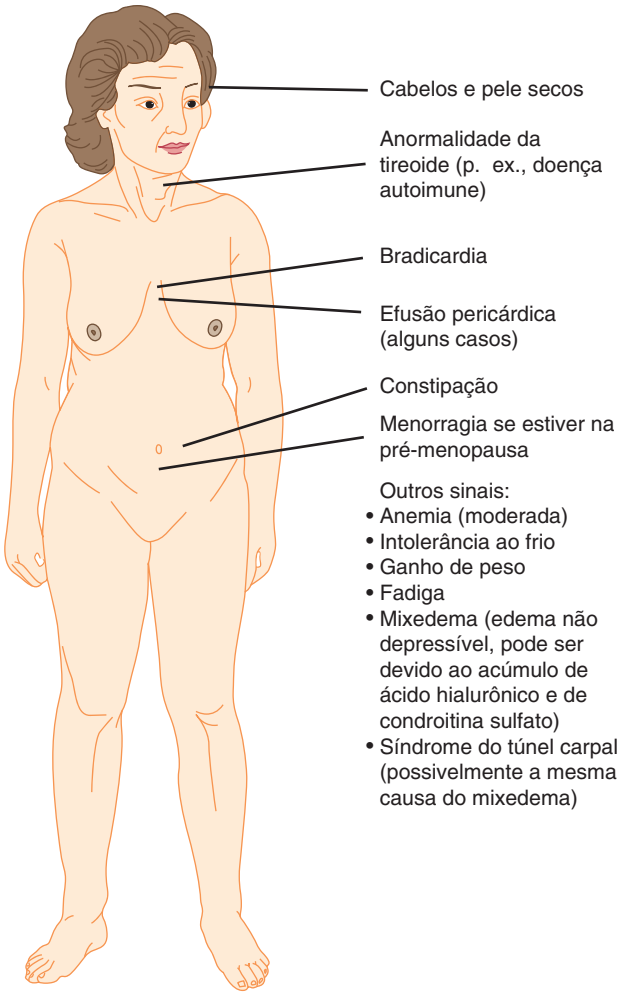


FIGURA 57-15 Alguns dos principais sinais de hipotireoidismo.

Tratamento

A história clínica, o exame físico e os resultados laboratoriais foram todos consistentes com hipotireoidismo primário. Deste modo, a paciente iniciou o tratamento com pequenas doses de **tireoxina** (T_4). É importante iniciar a terapia com pequenas doses de T_4, uma vez que altas doses podem precipitar eventos cardíacos sérios devido a alterações no metabolismo provocadas pela administração do hormônio. A dose de T_4 é gradualmente aumentada em intervalos de seis a oito semanas, até um máximo de aproximadamente 125 μg. A avaliação do progresso é feita pela dosagem do TSH, que deve cair, eventualmente, para os níveis de variação normal e neles devem ser mantidos. Avaliações regulares são importantes. Uma vez iniciada, a terapia com T_4 é, geralmente, **contínua por toda a vida**.

Discussão

O hipotireoidismo **primário** é uma condição relativamente **prevalente**, e é, provavelmente, o problema endócrino mais comum (excluindo o diabetes melito) observado na prática clínica. A causa mais frequente no mundo é a **ingesta deficiente de iodo**. Na América do Norte (como no presente caso) e em outros países

desenvolvidos, a causa principal é a **doença de Hashimoto**, uma condição autoimune que afeta a tireoide. **Outras causas** incluem a ablação da tireoide com I^{131}, a ressecção cirúrgica da tireoide e o uso de fármacos para o tratamento do hiportireoidismo. Ela é mais comum em **mulheres** do que em homens. Nesse caso, o diagnóstico foi relativamente fácil devido à história clássica e aos achados clínicos. Entretanto, frequentemente o seu **início é insidioso**, desenvolvendo-se gradualmente ao longo dos anos, e pode não ser percebido. Pode-se defender a dosagem rotineira de TSH em todas as pessoas acima de 35 anos, mas ainda não há consenso a esse respeito.

O hipotireoidismo **secundário** é muito menos comum e é devido a uma diminuição na secreção de TSH por várias condições patológicas que afetam a glândula hipófise. Patologias no **hipotálamo** podem causar hipotireoidismo **terciário** devido a uma diminuição na secreção do hormônio hipotalâmico liberador da tiroide (TRH). O hipotireoidismo **congênito**, em geral, se deve a vários bloqueios na síntese dos hormônios da tireoide, e pode resultar no **cretinismo** se não for diagnosticado precocemente e tratado adequadamente. Todos os recém-nascidos na América do Norte, e em muitos outros países, são rotineiramente testados para níveis de TSH no nascimento.

A detecção dos níveis aumentados de **TSH** sérico é o teste de maior utilidade para o hipotireoidismo. À medida que os níveis de hormônios da tireoide (T_4 e T_3) circulantes caem devido à destruição da tireoide na doença de Hashimoto, a inibição por retroalimentação na hipófise diminui, e os níveis de TSH aumentam.

A presença de **TSH elevado** e de **T_4 diminuído** é bastante indicativa de hipotireoidismo. Na **doença de Hashimoto**, a glândula tireoide se torna muito infiltrada por linfócitos e outras células inflamatórias, que gradualmente destroem e substituem grande parte da glândula, resultando em uma progressiva diminuição da secreção dos hormônios tireoidianos (ver Capítulo 41), levando ao estado de hipotireoidismo. Os linfócitos incluem células T $CD4^+$ ativadas específicas para vários antígenos tireoidianos. **Vários autoanticorpos** podem ser detectados no soro de pacientes com doença de Hashimoto; entre esses, frequentemente medidos, atualmente, estão os **anticorpos antitireoperoxidase** (**anti-TPO**), que servem como marcadores da doença de Hashimoto. Com muita frequência, há uma **história familiar** da doença ou de outras condições autoimunes, indicando uma contribuição **genética**. No presente caso, uma irmã da mãe da paciente tinha uma história familiar de "doença da tireoide" e uma irmã da paciente tinha anemia perniciosa, outra condição autoimune.

É importante considerar o hipotireoidismo como um diagnóstico, uma vez que o **tratamento precoce** pode fazer uma enorme diferença na qualidade de vida do paciente.

Um esquema simplificado da etiologia do hipotireoidismo é mostrado na **Figura 57-16**.

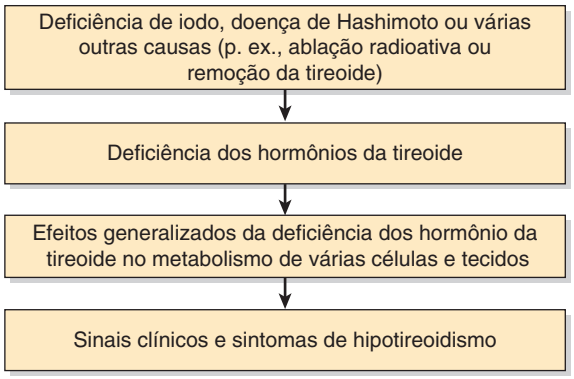


FIGURA 57-16 Esquema simplificado da etiologia do hipotireoidismo primário.

CASO 12: *KWASHIORKOR*, UM TIPO DE DESNUTRIÇÃO DE PROTEÍNA-ENERGIA (PEM)

Antes de estudar este caso, aconselha-se o leitor a consultar o material dos Capítulos 43 e 44 sobre nutrição. O Capítulo 43 contém informação sobre o equilíbrio energético, *kwashiorkor*, marasmo e aminoácidos essenciais.

Etiologia

Ingesta inadequada de alimentos levando à deficiência de energia e também de proteínas é a causa do marasmo e do *kwashiorkor*. A deficiência de nutrientes antioxidantes e o estresse da infecção precipitam o *kwashiorkor* em crianças malnutridas.

História e exame físico

Uma menina africana de dois anos de idade foi levada por sua mãe ao ambulatório do hospital local. A mãe tinha quatro filhos, o mais novo tinha três meses de idade e ainda era amamentado. O pai havia quebrado a perna em um acidente no ano anterior, e não era capaz de trabalhar desde então. A renda familiar, portanto, era baixa, e eles não eram mais capazes de comprar leite e carne regularmente. O principal alimento de subsistência da família era um mingau de amido, rico em carboidratos e pobre em proteínas, e, mesmo assim, era escasso recentemente. A mãe relatou que a filha estava comendo muito pouco há vários meses, apresentava diarreia intermitente nessa época e, recentemente, desenvolveu tosse e febre e se tornou irritável, fraca e apática.

No exame físico, ela estava abaixo do peso tanto para sua altura quanto para a sua idade. Sua temperatura era de 40,5°C. Sua circunferência do antebraço estava um pouco abaixo do normal. Sua pele era escamosa e seu cabelo seco, quebradiço e facilmente arrancável. O abdome estava distendido e o fígado moderadamente aumentado. Edema periférico era evidente. Estertores foram ouvidos nos lobos inferiores de ambos os pulmões.

O médico de plantão fez o diagnóstico de *kwashiorkor*, diarreia, pneumonia e possível bacteriemia.

Achados laboratoriais

Amostras de sangue foram retiradas para análise. Os resultados foram posteriormente relatados como hemoglobina 6,0 g/dL (normal para dois anos de idade: 11 a 14 g/dL), proteína sérica total 4,4 g/dL (normal: 6,0 a 8,0 g/dL) e albumina 2,2 g/dL (normal: 3,5 a 5,5 g/dL). Amostras de fezes e sangue foram colhidas para culturas; uma bactéria gram-negativa anaeróbia foi relata-

da posteriormente em ambas. A contagem de neutrófilos estava elevada (semelhante aos níveis encontrados em uma pneumonia bacteriana) e sua contagem de linfócitos estava muito diminuída. As radiografias de tórax revelaram opacidades manchando os lobos inferiores de ambos os pulmões, consistentes com broncopneumonia bilateral aguda.

Tratamento

Em muitos casos, o melhor é não tratar a criança com *kwashiorkor* leve ou moderado no **hospital**, porque isso só aumenta a chance de infecção. Entretanto, em vista de febre, fraqueza, sonolência e edema grave, essa paciente foi internada. Foi iniciado imediatamente um **antibiótico** adequado e uma **infusão de salina-dextrose intravenosa**. Infelizmente, sua condição piorou e ela morreu aproximadamente 12 h após a admissão. Os achados na necropsia foram compatíveis com *kwashiorkor* e também revelaram esteatose hepática severa e broncopneumonia.

Discussão

A PEM é o distúrbio nutricional mais comum em muitas partes do mundo. Cerca de um bilhão de pessoas sofrem de PEM de vários graus de gravidade. Ela se deve à ingestão dietética inadequada de proteína e energia; o *kwashiorkor* é comumente precipitado pelo estresse oxidativo de uma infecção. A PEM é quase sempre acompanhada por deficiências de **outros nutrientes** (p. ex., vitaminas, minerais, etc.). Crianças e idosos são particularmente suscetíveis, mas ela pode ocorrer em qualquer idade.

A PEM pode ser definida como **primária** (devido diretamente à deficiência de ingestão de energia e proteínas) ou **secundária** (devido ao aumento das necessidades de nutrientes, diminuição da absorção de nutrientes ou aumento da perda de nutrientes). Esse era um caso de *kwashiorkor* primário.

Muitas das características da PEM primária representam **adaptações** às deficiências dietéticas de energia e proteínas. Por exemplo, a atividade física diminui em função da ingestão deficiente de nutrientes. As reservas de glicogênio no músculo e fígado são capazes, apenas, de fornecer energia por um curto tempo (um dia ou dois) e, portanto, as reservas de gordura são mobilizadas para produzir energia.

Eventualmente, quando essas reservas se esgotam, as **proteínas são catabolizadas** (principalmente nos músculos) para fornecer aminoácidos e energia. Assim, pacientes com PEM apresentam pouca atividade, têm reservas de gordura no corpo diminuídas ou ausentes e mostram perda muscular, dependendo da gravidade da condição.

A PEM foi classificada em **edematosa** (*kwashiorkor*) e **não edematosa** (marasmo). A causa exata do edema do *kwashiorkor* ainda permanece em estudo. A **hipoalbuminemia** (devido ao deficiente fornecimento de aminoácidos para sintetizar as proteínas) é um fator contribuinte provável (ver Capítulo 50), embora não esteja estabelecido. O aumento da permeabilidade vascular devido ao estresse oxidativo secundário à infecção também pode ser importante. A deficiência do aminoácido **metionina**, um precursor da cisteína, também pode contribuir. A **cisteína** é um dos três aminoácidos presentes na **glutationa**, o maior antioxidante do corpo. Se os níveis teciduais de glutationa diminuem, há dano a várias moléculas e tecidos pelos radicais livres (ver Capítulo 45) e, talvez, danos às membranas celulares, aumentando a sua permeabilidade.

O **marasmo** é o resultado previsível da deficiência grave de energia, e a criança afetada apresenta menos de 60% do peso esperado para a idade. No ***kwashiorkor***, a criança tem 60 a 80% do peso esperado para a idade e é edematosa. Se a criança tem menos de 60% do peso para a idade e é edematosa, ela apresenta ***kwashiorkor* marasmático**, a forma mais grave e séria de PEM. Essa paciente exibia principalmente sinais de *kwashiorkor*. As **características distintivas do *kwashiorkor*** são hipoalbuminemia, fragilidade da pele (p. ex., dificuldade de cicatrização de feridas, úlceras), facilidade para arrancar os cabelos e edema (ver **Figura 57-17**). O *kwashiorkor* é a palavra usada pelos membros da tribo Ga em Gana para descrever "a doença do filho mais velho quando nasce a próxima criança". Ela se segue ao desmame do leite materno e à exposição a uma dieta pobre em proteínas e rica em carboidratos. A esteatose hepática é frequentemente encontrada no *kwashiorkor* devido à diminuição da síntese de apolipoproteínas no fígado, resultando no acúmulo de triglicerídeos. A pele e cabelos frágeis observados nessa doença se devem principalmente à deficiência de proteínas. A **hipoalbuminemia** é uma característica comum. Enquanto a deficiência de proteínas pode levar à hipoalbuminemia, a inflamação crônica também pode contribuir ao suprimir a síntese de albumina. A capacidade total de ligação do ferro e os níveis de transferrina também são reduzidos.

Hormônios podem ser importantes na geração do PEM. A exposição a uma ingesta relativamente elevada de carboidratos mantém os níveis de insulina elevados e os níveis de epinefrina e cortisol baixos no *kwashiorkor*, em oposição ao marasmo. A combinação de insulina baixa e cortisol elevado favorece muito o **catabolismo dos músculos**; portanto, a **perda muscular** é

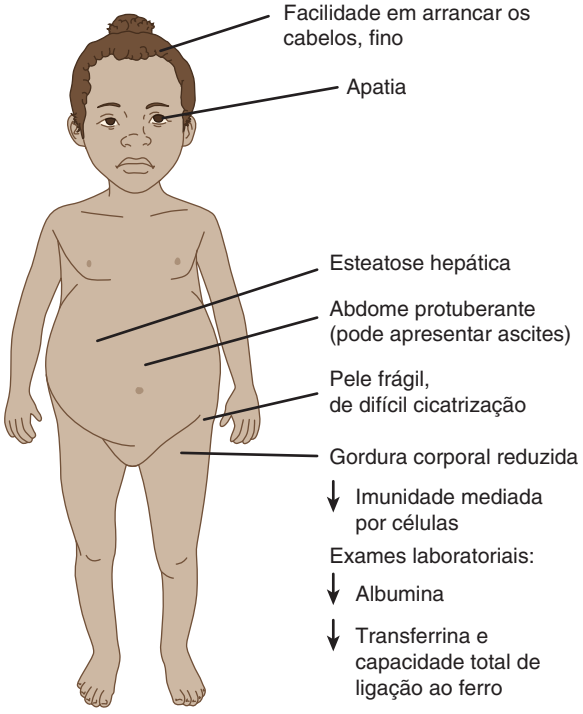


FIGURA 57-17 Alguns dos principais sintomas de *kwashiorkor*.

maior no marasmo do que no *kwashiorkor*. Além disso, devido aos níveis baixos de epinefrina, a gordura não é metabolizada na mesma extensão no *kwashiorkor*. O **sistema imune** está prejudicado na PEM, particularmente o funcionamento das células T. Os indivíduos são, portanto, muito suscetíveis a **infecções** (p. ex., causando diarreia), e as infecções pioram a situação ao colocarem uma demanda metabólica elevada no corpo (p. ex., por meio da febre). Algumas diferenças entre o *kwashiorkor* e o marasmo são resumidas na **Tabela 57-5**.

A PEM pode ser totalmente **prevenida** por uma dieta bem balanceada contendo quantidades adequadas dos principais macronutrientes, micronutrientes, vitaminas e minerais.

A **Figura 57-18** resume alguns dos mecanismos envolvidos no *kwashiorkor*.

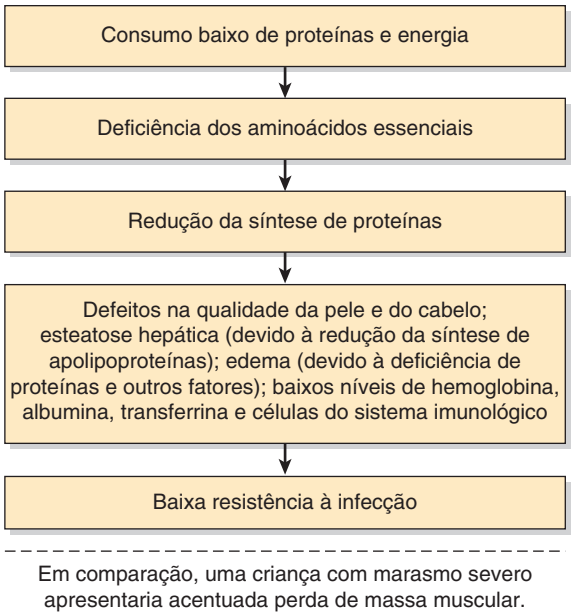


FIGURA 57-18 Resumo de alguns dos fatores de risco envolvidos na etiologia do *kwashiorkor*.

CASO 13: INFARTO DO MIOCÁRDIO (IM)

Etiologia

Falta de oxigênio e de vários metabólitos (devido ao bloqueio do fluxo sanguíneo em uma artéria coronária para uma área do miocárdio). Fatores **genéticos** e outros predispõem a essa situação.

História e exame físico

Um empresário de 46 anos de idade foi admitido no departamento de emergência do hospital local, queixando-se de severa dor retroesternal de uma hora de duração. Ele já havia sido admitido no hospital uma vez para tratamento de um pequeno IM, mas, apesar desse fato, ele continuou a fumar intensamente. Ele havia sido aconselhado a ingerir uma dieta predominantemente vegetariana e com restrição de sal, adotar um programa de exercícios, e a tomar um inibidor de HMG-CoA redutase (uma estatina) (seu colesterol total e LDL colesterol estavam elevados e o HDL diminuído) e uma combinação de diurético tiazídico e de um inibidor da ACE (enzima conversora de angiotensina) para a hipertensão moderada. Ele também estava tomando uma aspirina (81 mg) por dia. Sua pressão arterial era de 150/90 mmHg (antes desse incidente, ela estava em 140/80 mmHg; provavelmente elevada devido ao estresse), o pulso era de 60/min, e ele estava transpirando profusamente. Não havia evidência de insuficiência cardíaca. Seu pai havia morrido com 52 anos de idade de um "ataque cardíaco", e um de seus dois irmãos havia tido um IM com 49 anos de idade. Devido ao diagnóstico de admissão de IM provável, foi administrada morfina para aliviar a dor e a ansiedade, e também por seus efeitos de dilatação das coronárias, e ele foi imediatamente transferido para uma unidade de tratamento cardíaco, onde a monitoração eletrocardiográfica contínua foi iniciada imediatamente.

TABELA 57-5 Algumas diferenças entre o *kwashiorkor* e o marasmo

	Kwashiorkor	Marasmo
Edema	Presente	Ausente
Início	Rápido (p. ex., semanas), frequentemente associado a estresses tais como infecções	Gradual (meses a anos)
Hipoalbuminemia	Presente e pode ser grave	Leve se estiver presente
Perda muscular	Ausente ou leve	Pode ser muito grave
Gordura corporal	Reduzida	Ausente

Nota: pacientes com *kwashiorkor* marásmico apresentam combinações variáveis das características acima.

Achados laboratoriais

O ECG inicial mostrou uma elevação do segmento S-T e outras alterações em algumas derivações, indicativas de um infarto ventricular esquerdo transmural anterior agudo. Foi colhido sangue inicialmente e, depois, em intervalos regulares, a determinação da troponina T; na admissão, os níveis estavam dentro dos limites normais, mas subiram oito vezes seis horas após a admissão. Algumas proteínas e enzimas que foram utilizadas no diagnóstico de infarto do miocárdio são indicadas na **Figura 57-19**. A utilização de enzimas e proteínas no diagnóstico de IM e de outras doenças é discutida no Capítulo 7. Os níveis de colesterol total e da relação entre colesterol LDL/HDL estavam dentro dos limites normais (<5,17 mmol/L e 4:1, respectivamente), e os triglicerídeos estavam em 1,50 mmol/L (normal <2,26 mmol/L).

Tratamento

O cardiologista de plantão, após revisar todos os aspectos do caso, decidiu administrar o **ativador do plasminogênio tecidual (t-PA)** (ver Capítulo 51) intravenosamente devido ao diagnóstico de IM transmural anterior. Cerca de 1,5h havia se passado des-

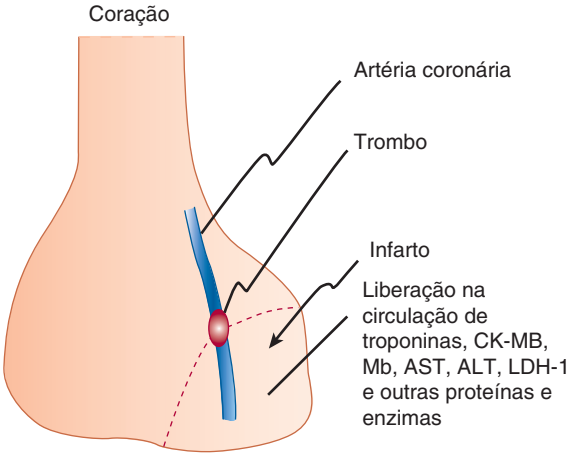


FIGURA 57-19 Representação diagramática de um trombo na artéria coronária resultando na liberação de várias proteínas e enzimas na circulação a partir e uma área de infarto do miocárdio (IM). Várias proteínas e enzimas são liberadas do tecido infartado em taxas distintas e elas apresentam diferentes meias-vidas na circulação. Atualmente, as troponinas são amplamente usadas para auxiliar no diagnóstico de IM, mas as outras enzimas mostradas ainda são utilizadas em graus variáveis e foram mais empregadas extensivamente no passado. (Mb, mioglobina; CK-MB, a isozima MB da creatina-quinase; AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; LDH-1, a isozima de lactato desidrogenase do músculo cardíaco.)

de o início dos sintomas. A dor torácica começou a desaparecer após 12 h, e o paciente foi se sentindo melhor. Ele recebeu alta do hospital sete dias após, sob os cuidados do seu médico de família. Ele foi orientado a continuar a sua medicação, a participar de um programa de reabilitação cardíaca e a parar de fumar.

Discussão

Um IM é geralmente provocado por um **trombo oclusivo** próximo a uma **placa aterosclerótica** instável que, muitas vezes, se rompeu há pouco tempo. A ruptura da placa ajuda a gerar o trombo. Em geral, o diagnóstico pode ser feito a partir da história clínica, dos resultados eletrocardiográficos e das dosagens seriadas de biomarcadores cardíacos, tais como a **troponina T**. A determinação dessa proteína substituiu a CK-MB em muitos hospitais (ver Capítulo 7).

Os objetivos principais do tratamento são a prevenção da morte por arritmias cardíacas por meio da administração de fármacos adequados e a limitação da extensão do infarto. Nesse caso, foi tomada a decisão de limitar o tamanho do infarto pela **administração de t-PA**, que pode dissolver ou limitar o crescimento do trombo (ver Capítulo 51) se administrado em até 12 h a partir do início dos sintomas, embora a administração seja preferível mais cedo. Uma alternativa seria a **intervenção coronária percutânea** (PCI), que consiste em angioplastia coronária transluminal percutânea (PTCA) com ou sem a inserção de um *stent*.

A **aterosclerose**, a **trombose coronariana** e o **IM** são discutidos aqui muito brevemente; um livro-texto de patologia deveria ser consultado para descrições mais detalhadas. A aterosclerose consiste em placas irregulares na íntima de artérias médias e grandes. A **disfunção endotelial** desempenha um importante papel na gênese da aterosclerose. As plaquetas e a fibrina podem se depositar no espaço luminal de uma artéria, e células musculares lisas monoclonais presentes na camada média de artérias crescem para a lesão da íntima, atraídas por fatores de crescimento liberados por macrófagos e plaquetas (p. ex., fator de crescimento derivado de plaquetas). Lipoproteínas plasmáticas, glicosaminoglicanos, colágeno e cálcio se acumulam subsequentemente em uma lesão chamada de **placa gordurosa**. A presença de **LDL oxidada** na lesão aterosclerótica parece ser particularmente importante, na medida em que estimula o recrutamento de macrófagos (células inflamatórias) e estimula a liberação de fatores de crescimento. Portanto, a **inflamação** é um fator essencial na aterosclerose, como refletido pelo acúmulo de macrófagos e linfócitos. O nível plasmático elevado de **proteína C reativa** (CRP) (Capítulo 50) é também um reflexo da inflamação crônica.

À medida que os processos acima evoluem, as placas gordurosas se desenvolvem em uma **placa na íntima**. Inflamação e hemorragia na placa podem ocorrer, levando à ruptura da sua superfície e exposição de seus constituintes subjacentes à corrente sanguínea. As plaquetas irão se aderir ao colágeno exposto, e se iniciará a formação de um **trombo** (Capítulo 51).

Os **fatores de risco** para a aterosclerose incluem a idade, história familiar, sexo masculino, níveis elevados de LDL e níveis baixos de HDL, hipertensão arterial, diabetes melito e o fumo. Esse paciente tinha níveis elevados de colesterol total e de LDL e níveis baixos de HDL antes de iniciar o tratamento dietético e medicamentoso.

Se o trombo em uma artéria coronária ocluir aproximadamente 90% da parede do vaso, o fluxo sanguíneo por meio do vaso afetado pode cessar (**isquemia total**) e o suprimento de oxigênio da área afetada do miocárdio será rapidamente comprometido. O metabolismo normal do miocárdio é **aeróbio**, com a maior parte do seu ATP sendo derivado da fosforilação oxidativa. A anóxia secundária à isquemia total resulta em uma mudança para **glicólise anaeróbia**, que gera apenas cerca de um décimo do ATP produzido pela fosforilação oxidativa. Não ocorre apenas essa mudança no metabolismo, mas o fluxo de substratos para o miocárdio pelo sangue e a remoção de seus produtos metabólicos também estão muito reduzidos. Esse acúmulo de metabólitos intracelulares aumenta a pressão oncótica intracelular, resultando em edema celular por afetar a permeabilidade da membrana plasmática. Portanto, o miocárdio acometido apresenta um esgotamento de ATP, acúmulo de ácido lático, desenvolvimento de acidose severa e redução acentuada da força de contração. As **alterações metabólicas precisas que comprometem a célula levando à sua morte** estão sendo investigadas em muitos laboratórios; essa é uma área muito importante de pesquisa. As alterações em estudo incluem o esgotamento de ATP, a ativação de fosfolipases intracelulares (resultando em dano para as membranas celulares), a ativação de proteases intracelulares e o acúmulo de Ca^{2+} intracelular. Alguns dos mecanismos envolvidos na etiologia de um IM agudo estão resumidos na **Figura 57-20**.

CASO 14: OBESIDADE

Antes de estudar este caso, aconselha-se o leitor a consultar o material dos triacilgliceróis e tecido adiposo no Capítulo 25 e o material sobre nutrição nos Capítulos 43 e 44.

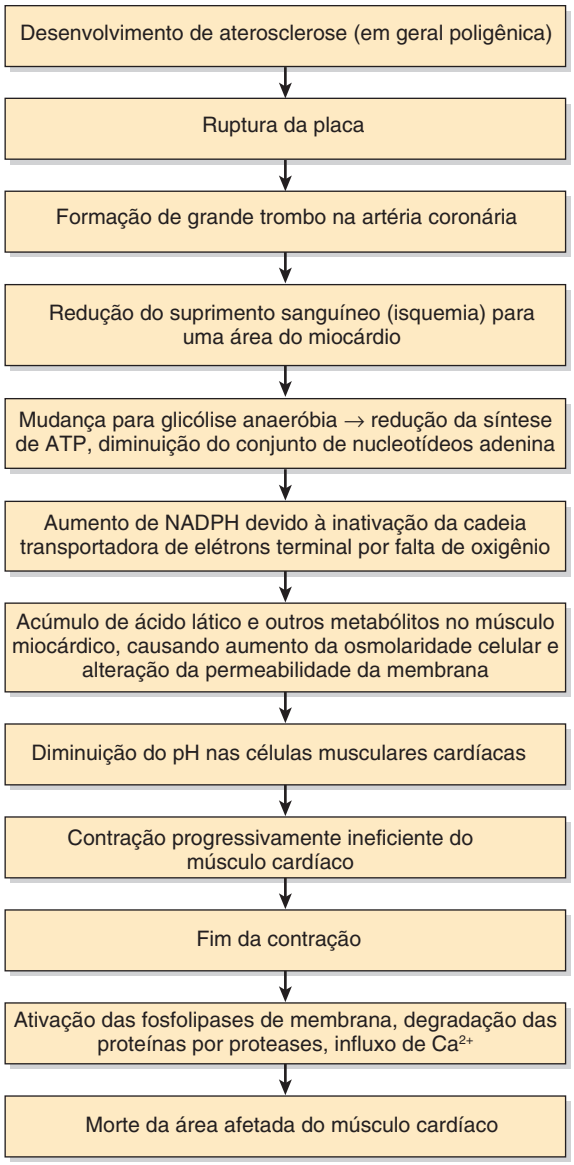


FIGURA 57-20 Resumo dos mecanismos envolvidos na etiologia do infarto agudo do miocárdio. As setas não implicam uma relação causal explícita em todos os casos.

Etiologia

Muitos fatores contribuem para a obesidade (genéticos, ambientais, culturais, etc.). Entretanto, a questão central é que o consumo de energia excede o gasto de energia dispendida, resultando no armazenamento de triacilgliceróis no tecido adiposo.

História, exame físico e achados laboratoriais

Uma mulher de 30 anos de idade procurou seu médico de família queixando-se de estar muito acima do peso. Ela era casada, mas não tinha filhos. Também se queixava de que seus ciclos menstruais eram irregulares. Não tinha nenhum histórico passado significativo e não usava nenhum medicamento. A paciente relatou que sempre teve tendência para ficar acima do peso e que sua mãe e suas irmãs também estavam. Ela tinha um trabalho sedentário em um escritório e não fazia exercícios regularmente. Além disso, disse ter um "apetite saudável", e que tanto ela quanto seu marido (que também estava acima do peso) consumiam frequentemente uma variedade de *fast foods*. Muitos indivíduos obesos negam que comem excessivamente e é difícil medir precisamente o consumo de alimento em uma consulta médica comum.

No exame físico, ela estava obviamente acima do peso (91 Kg) para a sua altura (1,63 m). Seu **índice de massa corporal** (IMC= peso kg/altura m^2) foi calculado a partir de uma tabela e foi encontrado o valor aproximado de 34. O IMC de 25 a 29,9 kg/m^2 indica sobrepeso e um IMC de >30 kg/m^2 indica obesidade. Outros indicadores clínicos de obesidade incluem a **relação cintura/quadril** e a **espessura da dobra cutânea**. Se a gordura se acumula em volta do abdome, isso confere à pessoa um **formato de maçã**, enquanto se a gordura se acumula em torno das nádegas, isso lhe confere um **formato de pera**. A primeira forma pode ser mais perigosa, uma vez que a gordura abdominal (visceral) sob ação da lipólise pode liberar ácidos graxos na veia porta, levando à deposição de gordura no fígado e nos músculos. **Ferramentas mais precisas** para medir a obesidade também estão disponíveis (p. ex., análise da impedância bioelétrica e pesagem subaquática). Sua pressão arterial era de 140/95 e seu colesterol total era de 6,1 mmol/L (no limite superior). O exame de urina foi negativo. Sua glicose plasmática em jejum era de 6,6 mmol/L (no limite superior).

Tratamento

Seu médico avisou que ela estava obesa, mas não com obesidade mórbida (IMC >40). Os resultados laboratoriais indicaram que os seus níveis de colesterol e glicose plasmática estavam no limite superior, bem como sua pressão arterial. Ele lhe disse que elevações acima desses valores a predisporiam à **doença cardíaca**, ao **diabetes melito**, à **hipertensão arterial** e à **síndrome metabólica**. Esta última é caracterizada pelo excesso de gordura abdominal, glicose plasmática elevada (resistência à insulina), lipídeos plasmáticos anormais (aumento do LDL e diminuição do HDL) e pressão arterial elevada. Ele também apontou para uma série de **outras complicações** às quais a obesidade a predisporia (p. ex., problemas de reprodução tais como irregularidades no ciclo menstrual, doença da vesícula biliar, trombose venosa profunda, apneia do sono, etc.). Ele explicou à paciente que o tratamento da obesidade não era fácil, e que ela teria de passar por **uma mudança permanente no seu estilo de vida** se ela desejasse que o tratamento fosse bem-sucedido e que a perda de peso fosse mantida. As **principais abordagens para o tratamento** da obesidade foram resumidas em: (1) dieta, (2) exercícios, (3) psicoterapia, (4) medicamentos (p. ex., basicamente para reduzir o apetite ou atuando como um inibidor da atividade da lipase no intestino e, assim, reduzindo a absorção de ácidos graxos), e (5) cirurgia (p. ex., banda gástrica ajustável por laparoscopia) em casos muito graves.

O médico afirmou que, no seu caso, ele acreditava que um progresso satisfatório poderia ser feito, pelo menos inicialmente, pelo uso das duas primeiras linhas de tratamento. Ele disse à paciente que raramente recomendava medicamentos para o tratamento de obesidade e que a cirurgia era, geralmente, restrita às pessoas com obesidade mórbida (IMC >40) que não responderam a outras abordagens. Ele também a encorajou a envolver o seu marido – ele também apresentava sobrepeso –, pois seria um tratamento mutuamente benéfico.

Em relação à **dieta**, seu médico (que tinha um interesse especial em implementar uma nutrição saudável em sua prática) discutiu as características gerais de uma dieta adequada e também as vantagens de **exercícios diários regulares**. As recomendações dietéticas específicas que ele fez estão listadas na **Tabela 57-6**.

Posteriormente, ela se juntou a uma **organização de perda de peso** e fez mudanças acentuadas no seu **comportamento** (p. ex., desenvolvendo hábitos alimentares conscientes, recompensas por bons resultados, grupos de aconselhamento) e também fornecendo apoio e encorajamento para outros membros. A paciente estava muito interessada em perder peso, e durante todo o ano seguinte ela seguiu de perto todos os conselhos dados. Ela perdeu 15,4 kg nesse período de tempo. Ela se sentiu muito bem e também relatou que seu ciclo menstrual se regularizou, e que tinha esperança de engravidar. Além disso, sua pressão arterial e seus níveis de colesterol total e glicose plasmáticos caíram para valores normais. Ela estava absolutamente determinada a continuar no programa de perda de peso, bem como o seu marido. Sua única queixa era que não tinha perdido ainda mais peso. Muitos pacientes em tratamento para obesidade voltam a ganhar o peso perdido, por uma série de razões.

Discussão

A obesidade é uma condição muito prevalente, e que está aumentando. Quase **um terço dos adultos** nos Estados Unidos são obesos e, o mais alarmante, cada vez mais crianças são obesas. Fala-se em uma epidemia de obesidade na sociedade ocidental. Analisar todos os fatores que contribuem para isso é complexo, mas o **aumento do consumo de energia** e a **redução do gasto energético** desempenham papéis importantes. O aumento do consumo de *fast foods* e de refrigerantes muito calóricos e assistir TV "acompanhado de batatas fritas" são contribuintes consideráveis. Enquanto os perigos da obesidade têm sido amplamente divulgados, é de interesse perceber que alguns indivíduos obesos sintam que estão sendo, injustamente, o alvo de profissionais de saúde, e que os perigos da obesidade têm sido superestimados. Pode ser discutido se é melhor ser um pouco obeso e adaptado, do que estar com o peso normal e inadaptado. Além disso, alguns indivíduos afirmam que gostam de ser obesos.

Enquanto a obesidade é relativamente fácil de ser reconhecida e definida (p. ex., podemos, de algum modo, usar arbitrariamente um IMC >30), precisar os fatores específicos que contribuem para casos individuais não é tão fácil.

No presente caso, **um certo número de fatores contribuintes** é aparente. Por exemplo, ela tinha um estilo de vida sedentário, frequentemente comia *fast foods*, não fazia exercícios regularmente, etc. Entretanto, qual era a sua ingesta calórica exata? Qual era exatamente o seu gasto de energia? Estavam todos os mecanismos de controle do apetite (ver **Figura 57-21**) funcionando adequadamente? Qual papel, se é que existe algum, desempenham os fatores genéticos em sua obesidade (ela tinha uma história familiar de obesidade)? Esses fatores não são fáceis para um(a) médico(a) quantificar em seu consultório. Devido à sua importância médica, muita pesquisa vem sendo realizada no campo da obesidade. Isto abrange a pesquisa básica sobre o adipócito e os mecanismos de sinalização para estudos epidemiológicos, em várias populações, e suas suscetibilidades à obesidade. Aqui, são mencionadas três áreas brevemente: (1) a regulação do apetite e a ingestão de alimentos; (2) alguns aspectos genéticos; e (3) alguns aspectos do gasto de energia.

TABELA 57-6 Resumo de aconselhamento dietético relativo à perda de peso

Adquirir informação em relação à nutrição geral e calorias e estudar os rótulos das embalagens dos alimentos.
Começar uma dieta de baixas calorias (cerca de 1.200 calorias/dia) contendo as quantidades adequadas de carboidratos, proteínas e gorduras.
Comer refeições menores com mais frequência.
Reduzir o consumo de açúcares simples e de carboidratos refinados e aumentar o consumo de carboidratos complexos (grãos, etc.) e alimentos com índice glicêmico baixo.
Reduzir o consumo de carne vermelha e processada.
Reduzir o consumo de gorduras saturadas e aumentar o consumo de gorduras monoinsaturadas, poli-insaturadas e ácidos graxos ômega 3.
Reduzir o consumo de sal.
Aumentar o consumo de frutas frescas, vegetais, legumes, nozes e laticínios de baixa gordura.
Reduzir acentuadamente o consumo de *fast foods* e de refrigerantes ricos em calorias.
Evitar quaisquer dietas da moda.
Beber água de boa qualidade.
Tomar suplementos de vitaminas e minerais.
Consultar um nutricionista para mais detalhes sobre dieta e nutrição.
Participar de uma organização que se especializa em aconselhar pessoas sobre perda de peso e seguir um programa de exercícios diários.

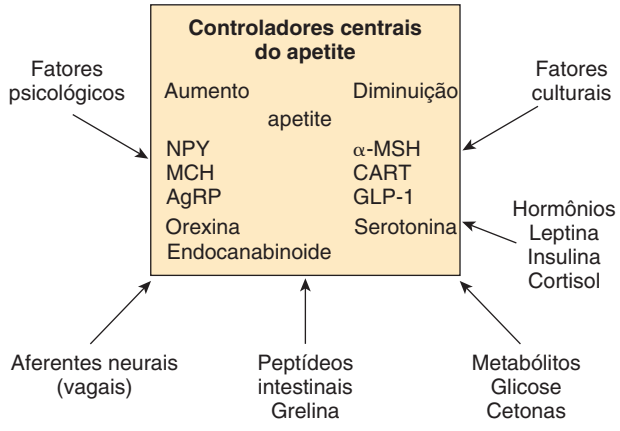


FIGURA 57-21 Fatores que regulam o apetite por meio dos efeitos nos circuitos neurais centrais. Fatores que aumentam ou diminuem o apetite são listados. (NPY, neuropeptídeo Y; MCH, hormônio concentrador de melanina; AgRP, peptídeo agouti; MSH, hormônio estimulante de melanócitos; CART, transcrito relacionado à cocaína e anfetamina; GLP-1, peptídeo 1 relacionado ao glucagon; CCK, colecistocinina; PYY, peptídeo YY). O leitor é aconselhado a consultar um livro de fisiologia para as descrições dos modos de atuação dessas várias moléculas. (Reproduzida, com permissão, de Harrison's *Principles of Internal Medicine*, 17th ed, Fauci AS et al [editores], McGraw-Hill, 2008).

A Figura 57-21 resume o conjunto de conhecimentos a respeito da **regulação do apetite**. O **hipotálamo** desempenha um papel fundamental na regulação central do apetite. São mostrados fatores que aumentam e diminuem o apetite. Fatores psicológicos, neurais e culturais são importantes. Diversos peptídeos, que afetam áreas específicas do hipotálamo, são indicados. Além disso, os níveis de metabólitos circulantes (p. ex., glicose) e de hormônios afetam os centros hipotalâmicos. Quanto aos hormônios, por exemplo, indivíduos com síndrome de Cushing (níveis elevados de cortisol e outros hormônios relacionados) são obesos e exibem uma distribuição característica da gordura corporal. Interesse específico tem se centrado na **leptina**, um polipeptídeo liberado por adipócitos que atua principalmente no hipotálamo. Níveis elevados de leptina diminuem a ingestão de alimentos e também aumentam o gasto de energia. A leptina foi descoberta por meio de estudos com camundongos geneticamente obesos (ob/ob). Em humanos, a leptina é o produto do gene *OB*. Os níveis de leptina são elevados na maioria dos obesos humanos, sugerindo que, de algum modo, eles devem ser resistentes à sua ação.

As **influências genéticas** na obesidade têm sido reconhecidas. Gêmeos idênticos tendem a ter pesos corporais semelhantes. Foram identificados casos ocasionais de mutações nos genes que codificam a leptina e o receptor de leptina. Foram descritos casos de indivíduos obesos com mutações no gene que codifica a pró-opiomelanocortina (POMC), que é processada para formar o hormônio melanócito α (α-MSH), poderoso inibidor do apetite. Além disso, foram relatadas mutações no gene que codifica o receptor de tipo 4 para o α-MSH e nos genes que codificam duas enzimas proteolíticas envolvidas na conversão do POMC em α-MSH.

Crianças com a **síndrome de Prader–Willi** (devido à deleção de parte do cromossomo 15; indivíduos afetados comem demais, entre outros sinais) e com a **síndrome de Laurence–Moon–Biedl** distúrbio genético recessivo autossômico) são caracteristicamente obesos. Deve ser ressaltado que a grande maioria dos indivíduos obesos não apresenta, aparentemente, mutações nos genes referidos acima. Entretanto, é provável que vários fatores genéticos sutis (p. ex., polimorfismos de nucleotídeo único, SNP) influenciem a obesidade.

Quanto ao **gasto de energia**, a ingestão de alimentos é difícil de ser medida precisamente, exceto em ambientes de pesquisa. Um método sofisticado para medir a quantidade de energia dispendida, utilizando água duplamente marcada, é descrito no Capítulo 44, bem como são os conceitos de taxa metabólica basal (TMB) e outros fatores envolvidos no gasto de energia diário. Parece que a maioria dos indivíduos obesos têm gasto energético mais elevado que pessoas com peso normal, porque sua massa corporal magra é maior. Outra questão importante é saber se realmente os obesos comem mais do que indivíduos não obesos. Parece provável que eles o façam, embora muitos neguem isso. No presente caso, parece provável, por sua história, que a paciente realmente comia muito. Uma questão que tem sido objeto de debate é o possível papel das **variações da termogênese induzida por dieta** (ver Capítulo 25) na contribuição para a obesidade. O tecido adiposo marrom contém uma proteína mitocondrial conhecida como **termogenina** (proteína desacopladora 1), que dissipa a energia como calor.

Embora o tecido adiposo marrom não seja um componente importante nos adultos (ao contrário dos recém-nascidos), ele ocorre. Parece também que sua quantidade está diminuída em alguns indivíduos obesos, o que poderia significar que eles dissipam menos energia como calor do que indivíduos não obesos e a apresentam mais disponível para outros propósitos. **Duas outras proteínas desacopladoras** são conhecidas nos tecidos humanos, embora sua contribuição geral para a termogênese induzida pela dieta não esteja claramente estabelecida. Portanto, muitos fatores podem contribuir para a obesidade e não é fácil avaliar a sua contribuição na maioria dos casos observados na prática clínica. Atualmente, é razoável tratar a obesidade reduzindo, principalmente, a ingestão de alimentos, ingerindo uma dieta saudável, aumentando a atividade física e oferecendo apoio adequado e encorajamento. Um modo pelo qual o etanol pode perturbar as funções dessas proteínas é **substituindo as moléculas de água** em vários locais críticos.

A **Figura 57-22** resume alguns fatores principais envolvidos na etiologia da obesidade.

CASO 15: OSTEOPOROSE PRIMÁRIA (PÓS-MENOPAUSA)

Antes de estudar este caso, aconselha-se o leitor a examinar o material do Capítulo 48 sobre osso e o material no Capítulo 44 sobre vitamina D.

Etiologia

A osteoporose é a perda de massa óssea com preservação da razão normal entre matriz orgânica (principalmente proteínas) e minerais. **Vários fatores** (endócrinos, nutricionais, ausência de atividade física, etc.) contribuem para o seu desenvolvimento. No tipo de osteoporose pós-menopausa tratado aqui, a **deficiência de estrogênio** é o principal fator.

História, exame físico e investigações

Uma senhora de 64 anos de idade chegou ao setor de emergência, pois tropeçou enquanto caminhava em seu jardim e, aparentemente, caiu suavemente sobre o seu braço direito. No entanto, ela suspeitava que havia fraturado um osso em seu braço, devido à dor e ao inchaço logo acima do seu pulso direito. A radiografia mostrou uma fratura da extremidade distal do rádio, com deslocamento. O rádio também mostrou uma moderada redução de sua radiodensidade, sugestiva de osteoporose. A fratura foi reduzida, foi colocado um gesso apropriado, e ela foi orientada a procurar seu médico de família em duas semanas. O médico do

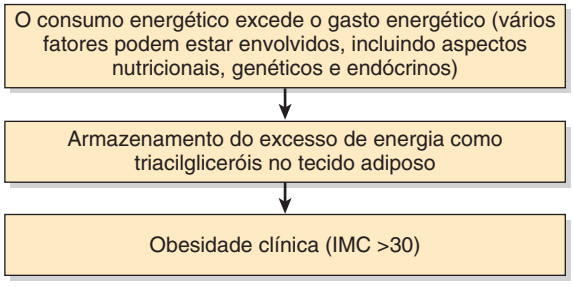


FIGURA 57-22 Esquema simplificado da etiologia da obesidade.

setor de emergência lhe deu um relatório para ela mostrar ao seu próprio médico, o qual mencionava que, devido à suavidade da sua queda, à fratura resultante e à radiodensidade reduzida de seu rádio, ele suspeitava que ela pudesse ter osteoporose. A paciente foi atendida por seu médico de família duas semanas depois. Ela tinha quatro filhos adultos. Seu último ciclo menstrual foi há mais ou menos cinco anos e só procurou seu médico, de forma irregular, ao longo dos anos para problemas menores ocasionais. Não tomava nenhum medicamento, nem qualquer suplemento de vitaminas e minerais, e nunca fez tratamento hormonal para menopausa. Comia poucas frutas e vegetais e, em geral, consumia uma dieta rica em carboidratos, além de boas quantidades de alimentos fritos. Fumava um maço de cigarros por dia e também bebia várias doses de vodca por noite. Além disso, raramente fazia exercícios.

A paciente se queixava de dores crônicas na parte inferior das costas, mas, por outro lado, não tinha outro histórico significativo. Em função da fratura e da hipótese de osteoporose, seu médico de família solicitou uma **absorciometria de raios X de dupla energia** (**DEXA**) das áreas da coluna lombar e dos quadris para avaliar a densidade óssea. Ele também solicitou radiografias da coluna inferior devido ao histórico de dor lombar inferior. Além disso, solicitou as determinações séricas de Ca, P, fosfatase alcalina, 25-hidroxi-vitamina D, paratormônio e exame de urina completo (incluindo a dosagem de cálcio em 24 h) para verificar qualquer outra doença óssea (p. ex., devido à deficiência de vitamina D, hiperparatireoidismo ou mieloma múltiplo). Os resultados de seu exame de DEXA mostraram uma acentuada redução (acima de 3 desvios-padrão; acima de 2,5 é o diagnóstico para osteoporose) em relação ao valor médio para mulheres de 25 anos de sua raça, compatível com osteoporose severa. As radiografias da sua coluna inferior mostraram radiodensidade diminuída, mas nenhuma fratura. Os resultados de seus exames de sangue e urina estavam dentro dos limites normais, sugerindo que ela não possuía nenhum outro distúrbio ósseo sério.

Quando a reabsorção óssea ocorre, há um aumento na produção de **produtos cruzados** (***cross-link***) **do colágeno**. Estes incluem o *N*-telopeptídeo, a desoxipiridinolina e o *C*-telopeptídeo. Em alguns casos de osteoporose, o **aumento da formação óssea** também ocorre; a fosfatase alcalina óssea e a osteocalcina são seus marcadores. Esses vários marcadores não são, em si, diagnósticos de osteoporose, mas podem ser medidos no soro ou na urina como **indicadores de resposta ao tratamento**. Por exemplo, uma redução de 30% desses marcadores poderia sugerir sucesso na terapia. Eles não foram medidos nesse caso e, de fato, não são medidos em muitos laboratórios clínicos.

Tratamento

O histórico, o exame DEXA e os resultados dos outros testes foram consistentes com um diagnóstico de osteoporose relativamente grave. A paciente foi aconselhada a iniciar um **programa de exercícios** imediatamente em uma academia, inicialmente com a supervisão de um treinador particular. Também foi encaminhada para um **nutricionista** para alterar os seus hábitos alimentares; as recomendações incluíam comer porções diárias regulares de frutas frescas e vegetais, consumindo uma dieta mais balanceada (p. ex., reduzindo o amido e as comidas fritas). Foi recomendado a ela que **parasse de fumar** e reduzisse seu consumo de **álcool**, uma vez que ambos podem contribuir para a osteoporose. Ela também foi medicada com doses diárias de **citrato de cálcio e vitamina D**. Além disso, seu médico recomendou que ela começasse a tomar **bisfosfonato** (p. ex., alendronato ou risedronato), fornecendo instruções detalhadas sobre como tomar o medicamento. Esses dois fármacos contendo N-bisfosfonatos são absorvidos pelos osteoclastos e inibem a formação de difosfato de farnesila. Este, por sua vez, inibe a **prenilação de certas proteínas** (ver Figura 26–2) e sua ligação à membrana plasmática, afetando negativamente a atividade dos osteoclastos e, portanto, inibindo a reabsorção óssea. **Outros fármacos** que podem ser usados no tratamento da osteoporose, em casos selecionados, incluem a calcitonina de salmão, o estrogênio, moduladores de estrogênios seletivos (p. ex., raloxifeno) e o paratormônio. O estrogênio era, anteriormente, amplamente prescrito no início da menopausa para reduzir a osteoporose, e parecia ser relativamente eficaz. Entretanto, o Estudo Preliminar da Saúde das Mulheres mostrou que os riscos da terapia com estrogênios eram maiores do que os benefícios nessa situação.

A paciente foi acompanhada por alguns anos. Ela perdeu peso considerável e manteve seu programa de exercícios. Em geral, ela se sentiu muito mais saudável do que nos últimos 20 anos. Sua fratura consolidou satisfatoriamente, não houve mais perda de massa óssea, mas a massa óssea normal não foi restaurada. Ela foi aconselhada sobre como tomar precauções para evitar quedas e também lhe foi recomendado que usasse cintas acolchoadas nos quadris.

Discussão

A osteoporose pode ser definida como a **redução de massa ou densidade óssea**. Frequentemente, é detectada após uma fratura, uma vez que a perda de tecido ósseo predispõe a fraturas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) sugere a existência de osteoporose quando a **densidade óssea é igual ou mais de 2,5 desvios-padrão abaixo da média para um adulto jovem da mesma raça e gênero**. Nos Estados Unidos, cerca de 8 milhões de mulheres e 2 milhões de homens têm osteoporose e muitos outros estão em risco de desenvolvê-la.

Dois termos que são relacionados à osteoporose são a osteopenia e a osteomalácia. A **osteopenia** é a redução de massa óssea, englobando a osteoporose e a osteomalácia. Na **osteoporose**, a massa óssea diminui devido à redução da formação óssea e ao aumento da reabsorção, mas é preservada a relação normal entre o osso mineral (hidroxiapatita) e a matriz óssea (principalmente o colágeno tipo 1). A **osteomalácia** é também um exemplo de osteopenia, mas nesta há uma diminuição da mineralização; sua causa mais comum é a deficiência de vitamina D.

A osteoporose **primária** pode ser dividida em três tipos: **idiopática** (incomum, ocorre em crianças e adultos jovens), **pós-menopausa** e **involucional** (idosos). Esse caso é um exemplo de **osteoporose pós-menopausa** e a diminuição nos níveis de estrogênio é o fator principal na sua etiologia. Esse tipo também pode ocorrer em homens devido a uma diminuição na testosterona sérica, que atua para aumentar a atividade osteoclástica. A **osteoporose involucional** ocorre em indivíduos idosos e se deve à diminuição do número de osteoblastos com a idade. As osteoporoses pós-menopausa e involucional podem coexistir.

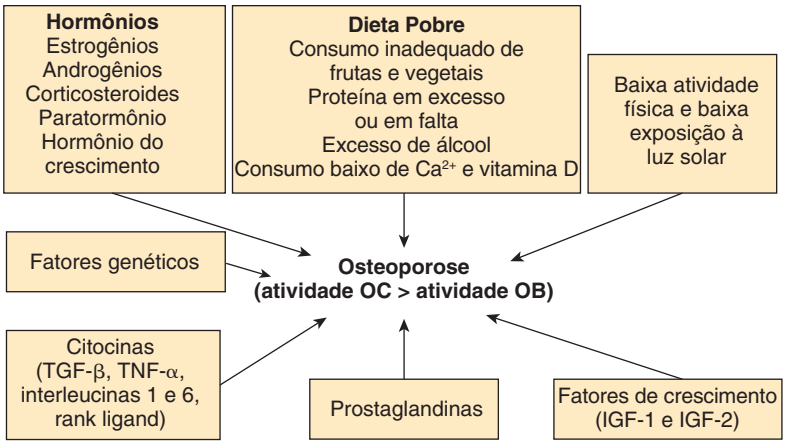


FIGURA 57-23 Esquema simplificado dos vários fatores envolvidos na etiologia da osteoporose. (OC, osteoclástica; OB, osteoblástica; IGF-1 e IGF-2, fatores de crescimento semelhantes à insulina; TGF-β, fator de crescimento transformador β; TNF-α, fator de necrose tumoral α.) Os hormônios listados têm uma variedade de efeitos nos ossos. O IGF-1 e o IGF-2 têm efeitos anabólicos no osso, mas também podem estimular a sua reposição. RANK-ligand é uma citocina que está envolvida na comunicação entre osteoblastos e osteoclastos; quando ela interage com os osteoclastos, ela aumenta sua atividade. As outras citocinas são produzidas pelos osteoblastos. Sua síntese aumenta ou diminui por deficiência de estrogênio, com o efeito geral de estender o tempo de vida dos osteoclastos (pela inibição da apoptose).

A **osteoporose secundária** é relativamente incomum, e pode decorrer de várias condições (p. ex., doença renal crônica, diversos fármacos [especialmente corticosteroides], vários distúrbios endócrinos, síndrome de má absorção, etc.).

Muitos fatores estão envolvidos na etiologia da osteoporose (ver **Figura 57-23**). Uma compreensão mais profunda deles requer o conhecimento da **modelação** óssea, de várias **citocinas**, das ações de **vários hormônios** e de vários **fatores genéticos** e **nutricionais**, entre outras considerações (as citocinas são um grupo heterogêneo de proteínas liberadas por várias células e que têm efeitos autócrinos ou parácrinos). Aqui, é somente indicada a complexidade de uma compreensão completa da osteoporose, sendo mencionados brevemente os principais envolvidos. O ponto central é que a osteoporose ocorre quando a **reabsorção óssea** (atividade osteoclástica [OC]) **excede à formação óssea** (atividade osteoblástica [OB]). Em relação à osteoporose pós-menopausa, em particular, uma consideração importante é que a **perda de estrogênio** parece aumentar a secreção de várias citocinas, que levam ao recrutamento de osteoclastos. A perda de estrogênio também diminui a secreção de algumas outras citocinas que promovem a atividade osteoblástica. O efeito geral é, portanto, um desequilíbrio entre osteoclastos e osteoblastos, em favor dos primeiros.

A **Figura 57-24** é uma representação esquemática simplificada da etiologia da osteoporose.

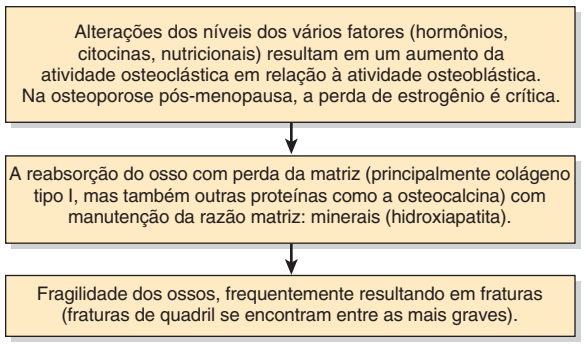


FIGURA 57-24 Esquema simplificado dos principais fatores na etiologia da osteoporose.

CASO 16: XERODERMA PIGMENTOSA (XP) (PELE SECA PIGMENTADA)

O leitor deve consultar o material no Capítulo 35 sobre o reparo de DNA e sobre XP antes de ler este caso.

Etiologia

Genética (uma mutação em um gene que direciona a síntese de uma enzima de reparo do DNA na via de reparo por excisão de nucleotídeos) e **física** (exposição à radiação ultravioleta [UV]) (**Figura 57-25**).

História e exame físico

Um garoto de oito anos de idade chegou a uma clínica de dermatologia com um tumor na pele da bochecha direita. Ele sempre evitou a exposição à luz solar porque isso provocava bolhas na sua pele. Sua pele apresentava áreas espalhadas de hiperpigmentação e outras áreas pareciam ligeiramente atrofiadas.

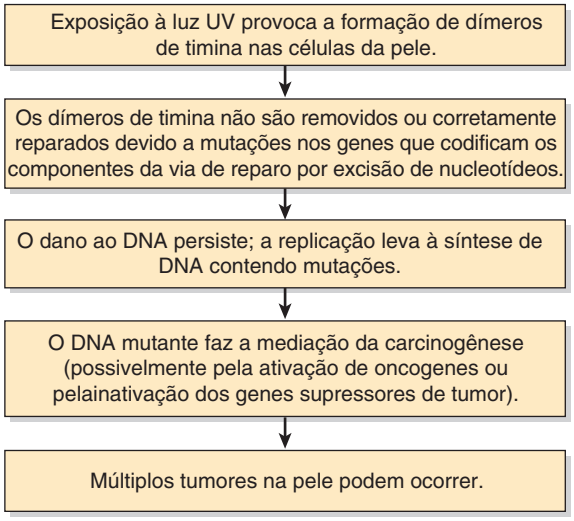


FIGURA 57-25 Resumo dos mecanismos envolvidos na etiologia da xeroderma pigmentosa (OMIM 278730 e outras entradas).

Não havia histórico familiar de distúrbio semelhante. Devido à presença de um tumor na pele em uma idade tão jovem, a história de evitar a luz solar e de outras lesões mais leves na pele, o dermatologista fez um diagnóstico provisório de XP.

Achados laboratoriais

O exame histológico do tumor excisado mostrou tratar-se de um **carcinoma de células escamosas** (um tipo comum de tumor canceroso de pele em pessoas idosas, mas muito raro em um garoto com essa idade). Um pequeno pedaço de pele foi removido para que uma **preparação de fibroblastos** crescesse em cultura de tecido, sendo enviada a um laboratório de pesquisa do hospital especializado em biologia da radiação para medir a quantidade de **dímeros de timina** (ver adiante) formados após a exposição à luz UV.

Os fibroblastos do paciente e os fibroblastos controle foram expostos à luz UV, e amostras de células foram examinadas em intervalos de oito horas, em um total de 32 horas após a irradiação. Foram preparados extratos de DNA e foi determinado o número de dímeros remanescentes em cada período de tempo indicado. Enquanto apenas 24% dos dímeros formados persistiram no extrato de DNA extraído de células normais com 32 horas, aproximadamente 95% foram encontrados no extrato de células do paciente com 32 horas. Isto demonstrou que as lesões induzidas por UV não foram reparadas e, portanto, confirmou o diagnóstico de XP.

Discussão

XP é uma doença **autossômica recessiva** rara em que os mecanismos para o reparo do DNA subsequente ao dano por irradiação UV não funcionam. Isto acontece devido a mutações nos genes que codificam os componentes da **via de excisão de nucleotídeos** do reparo de DNA (reparo por excisão de nucleotídeos, NER; ver Capítulo 35). O principal dano infligido ao DNA pela radiação UV é a formação de dímeros de timina (pirimidina) (também conhecidos como dímeros de pirimidina ciclobutano), nos quais são formadas ligações covalentes entre átomos de carbono 5 e 5 e 6 e 6 de resíduos de timina intracadeias adjacentes, resultando nos dímeros. Outros tipos de danos também podem ocorrer.

O **NER** possui duas subvias; o reparo do genoma global e o reparo acoplado à transcrição. O primeiro examina todo o genoma e remove as áreas danificadas rapidamente. O segundo está ligado à transcrição, opera lentamente, e remove o dano da fita transcrita de DNA.

Foram realizadas análises detalhadas do NER envolvidos na remoção dos dímeros de timina. A via é muito bem conservada entre as espécies, indicando a sua importância. Em geral, a via abrange quatro etapas principais, todas envolvendo várias enzimas: (1) **reconhecimento** do DNA danificado; (2) **excisão** da região danificada; (3); **preenchimento** do hiato pela DNA-polimerase; (4) **ligação** da área preenchida. Em *E. coli*, uma clivagem endonucleolítica catalisada por uma **endonuclease** específica (também chamada de uma excinuclease) ocorre em ambos os lados da lesão, liberando um oligonucleotídeo de 12 a 13 pares de bases. A etapa de polimerização envolve a **DNA-polimerase** e a etapa final é o fechamento pela **DNA-ligase**.

A via do NER opera em **humanos**, e seus detalhes ainda estão sendo elucidados. Parece ser, no geral, semelhante à via da *E coli*. A diferença mais notável é que um oligonucleotídeo muito grande (cerca de 30 bases) é extraído em humanos. Os produtos de pelo menos sete genes (que codificam XPA por meio de XPG) foram implicados no NER em humanos e todos foram clonados. Mutações em quaisquer desses genes causam XP. No menino cujo caso é discutido aqui, o gene específico envolvido não foi determinado.

Como os genes responsáveis foram clonados, o **diagnóstico pré-natal** de XP é atualmente possível utilizando-se sondas adequadas. A via do NER também está envolvida em outros processos além do reparo de DNA, tais como a replicação, recombinação e transcrição. O envolvimento de sete genes mencionados anteriormente no reparo do DNA foi originalmente demonstrado do seguinte modo. Foi observado que quando células de indivíduos com XP eram cultivadas junto a células de outros indivíduos, em condições em que a **fusão celular** pudesse ocorrer, o defeito no reparo do DNA poderia, algumas vezes, ser corrigido. Isto mostrou que um conjunto de células estava fornecendo um produto de gene normal para o outro e, portanto, corrigindo o defeito. Desse modo, pelo menos **sete grupos de complementação**, correspondendo aos sete genes e seus produtos mencionados anteriormente, foram reconhecidos.

Se o dano do UV não é reparado, ocorrerão **mutações no DNA**, anormalidades cromossômicas poderão ocorrer e o **câncer** pode se desenvolver. Pacientes com XP frequentemente sofrem de uma variedade de cânceres de pele desde uma idade precoce.

Como descrito no Capítulo 35, há **outras vias** de reparo do DNA operando em humanos. Todas são importantes na preservação da integridade do DNA, e as anormalidades de algumas delas foram associadas ao câncer (p. ex., reparo de troca).

Os pais do menino, no presente caso, foram informados que ele deveria ser **observado com atenção** ao longo da vida em virtude do desenvolvimento de novos cânceres de pele.

Além disso, o paciente foi aconselhado a **evitar luz solar** e usar **filtro solar** adequado. Embora a XP seja uma condição rara, a existência de vários mecanismos para o reparo de DNA após a exposição a diferentes tipos de radiação e agentes químicos tem uma **grande importância protetora**. Sem a sua existência, a vida no planeta seria repleta de muito mais perigos do que os que já existem. Por exemplo, estima-se que pacientes com XP têm 1.000 vezes mais chances de desenvolver câncer de pele do que indivíduos normais.

A Figura 57-25 resume os mecanismos envolvidos na etiologia da XP.

EPÍLOGO

Progressos notáveis foram feitos em bioquímica e em áreas relacionadas como a genética e a biologia celular. Muitas das descobertas nessas disciplinas tiveram grande impacto na medicina e em áreas relacionadas das ciências da vida. Conhecimentos cruciais sobre muitas doenças surgiram de estudos de suas bases moleculares. Novos medicamentos e tratamentos têm sido constantemente desenvolvidos com base em tais descobertas. Entretanto, é obvio que ainda há muitos grandes desafios para a ciência médica. A **Tabela 57-7** resume alguns deles. Os autores deste texto e outros bioquímicos acreditam que a aplicação da bioquímica, da genética e de abordagens afins a esses problemas e a outros não listados trarão benefícios a todo o mundo. Espera-se que alguns dos leitores deste texto venham a contribuir para tais empreendimentos.

TABELA 57-7 Alguns dos principais desafios enfrentados pela medicina e pelas ciências da saúde afins[1]

Tópico	Desafio
Envelhecimento	Compreensão de suas bases moleculares e talvez modificação de alguns dos seus efeitos.
Vários tipos de artrite e osteoporose	Compreensão de suas bases moleculares (p. ex., estudos adicionais sobre os papéis do ECM em sua etiologia) e melhora das terapias atuais.
Cânceres	Compreensão de suas bases moleculares (p. ex., estudos adicionais sobre oncogenes, genes supressores de tumores e do mecanismo de metástases), desenvolvendo melhores biomarcadores para o diagnóstico mais precoce e melhorando as terapias atuais.
Doenças cardiovasculares (p. ex., infartos do miocárdio e derrames)	Compreensão de suas bases moleculares (p. ex., aumento do conhecimento sobre aterosclerose e trombose) e melhora das terapias atuais.
Doenças neurodegenerativas crônicas (p. ex., doença de Alzheimer)	Compreensão de suas bases moleculares (p. ex., conhecimentos adicionais sobre os papéis de várias proteínas na sua etiologia) e melhora das terapias atuais.
Diabetes melito	Obtenção de maiores conhecimentos a respeito de suas causas e seus efeitos (p. ex., obtendo uma imagem completa de todos os aspectos da ação da insulina e dos mecanismos de dano tecidual tais como a glicação), melhorando a terapia.
Medicina ambiental	Esforço articulado entre cientistas e trabalhadores da área de saúde para impedir a degradação adicional do ambiente e impossibilitar efeitos potencialmente sérios na saúde.
Doenças genéticas	Determinação de suas bases moleculares e desenvolvimento de terapias gênicas e outros tratamentos (p. ex., uso de pequenas moléculas para ajudar as proteínas afetadas a se dobrarem adequadamente).
Infecções, incluindo Aids e doenças tropicais	Compreensão de suas bases moleculares, impedindo sua disseminação (p. ex., por meio do conhecimento crescente sobre a bioquímica dos microrganimos e dos seus mecanismos de ligação às células), melhorando as terapias atuais.
Nutrição	Melhoria do padrão mundial e combate a problemas como a má nutrição de proteínas-energia e a obesidade.
Pobreza	Encorajamento de um ataque global à pobreza, que é a raiz de muitos distúrbios físicos e mentais.
Doenças psiquiátricas	Compreensão de suas bases moleculares (p. ex., determinando quais genes estão envolvidos em doenças tais como esquizofrenia e transtornos bipolares) e melhorando as terapias atuais.
Bem-estar	Educação das populações a respeito de sua manutenção (saúde celular) e adoção de medidas (p. ex., nutrição, exercício, vacinas, saúde mental, evitação de toxinas) para ajudar a prevenir doenças.

[1]Abordagens bioquímicas e outras afins (genéticas, da biologia celular, imunológicas, patológicas, farmacológicas, etc.) serão decisivas no tratamento de vários desses desafios, bem como as abordagens de saúde pública.

REFERÊNCIAS

Aiuti A, et al: Gene therapy for immunodefi ciency due to adenosine deaminase deficiency. N Engl J Med 2009;360:447.

Beers MH, Porter RS, Jones TV, et al (editors): *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*. 18th ed. Merck Research Laboratories, 2006. (Th is book is available free online at http://merck.com/mmpe/index.html and contains coverage of many of the conditions discussed here).

Brunicardi FC, Anderson D, Billiar T, et al: *Schwartz's Principles of Surgery*. 9th ed. McGraw-Hill, 2009. (Chapter 29 contains a discussion of colorectal cancer).

Brunton LL, Blumenthal D, Buxton I, et al: *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Th erapeutics*. 11th ed. McGraw-Hill, 2005 (Chapter 22 contains a discussion of acute ethanol intoxication).

Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (editors): *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 4th ed. Elsevier Saunders, 2006. (Chapters 23 [Tumor Markers] and 49 [Mineral and Bone Metabolism] are of particular interest to the contents of this Chapter.)

Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, et al (editors): *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17th ed. McGraw-Hill, 2008. (Contains comprehensive descriptions of many of the conditions described here).

Freedman DH: How to Fix the Obesity Crisis. Sci American 2011; 304 (No. 2):40.

Kohn DB, Candotti F: Gene therapy fulfi lling its promise. N Engl J Med 2009;360:518. (Discusses aspects of the successful treatment of ADA defi ciency.)

Neogi T: Gout. N Engl J Med 2011;364 (No. 5):443.

Riordan JR: CFTR function and prospects for therapy. Annu Rev Biochem 2008;77:70.

Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of odf Inherited Disease*. 8th ed. McGraw-Hill, 2001. (Th e online version of this text contains comprehensive up-dated descriptions of many of the conditions discussed in this Chapter).

Shils ME, Shile M, Ross AC, et al (editors): *Modern Nutrition in Health and Disease*. 10th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2006. (Contains comprehensive coverage of nutritional topics, including PEM [Chapter 57] and obesity [Chapters 63 & 64]).

Questões para Estudo

Seção VI

1. O índice glicêmico de um alimento é uma maneira de avaliar o quão rapidamente o carboidrato daquele alimento é digerido e absorvido. Qual das seguintes opções define melhor o conceito de índice glicêmico?
   A. Redução da concentração de glucagon no sangue após o consumo de alimento comparado a uma quantidade equivalente de pão branco.
   B. Aumento na concentração de glicose no sangue após o consumo de alimento.
   C. Aumento da concentração de glicose no sangue após consumo de alimento comparado a uma quantidade equivalente de pão branco.
   D. Aumento da concentração de insulina no sangue após o consumo de alimento.
   E. Aumento da concentração de insulina no sangue após consumo de alimento comparado a uma quantidade equivalente de pão branco.

2. Qual dos alimentos a seguir tem o índice glicêmico mais baixo?
   A. Maçã cozida.
   B. Batata cozida.
   C. Maçã crua.
   D. Batata crua.
   E. Suco de maçã.

3. Qual dos alimentos a seguir tem o índice glicêmico mais alto?
   A. Maçã cozida.
   B. Batata cozida.
   C. Maçã crua.
   D. Batata crua.
   E. Suco de maçã.

4. Qual das seguintes opções melhor descreve a digestão e a absorção do triacilglicerol da dieta?
   A. A absorção de lipídeos parcialmente hidrolisados em micelas de lipídeos que são então incorporadas diretamente aos quilomícrons.
   B. Absorção do triacilglicerol em micelas de lipídeos que são então incorporadas aos quilomícrons.
   C. Hidrólise completa a ácidos graxos livres e glicerol no lúmen intestinal.
   D. Hidrólise a ácidos graxos livres e monoacilglicerol no lúmen intestinal, seguida de hidrólise completa do monoacilglicerol nas células da mucosa e reesterificação a triacilglicerol, acompanhando o padrão do triacilglicerol da dieta.
   E. Hidrólise a ácidos graxos livres e monoacilglicerol no lúmen intestinal, seguida de hidrólise parcial do monoacilglicerol nas células da mucosa e reesterificação a triacilglicerol com um padrão diferente de ácidos graxos daquele encontrado no triacilglicerol da dieta.

5. Esteróis e estanóis vegetais inibem a absorção de colesterol do trato gastrintestinal. Qual das seguintes opções melhor descreve seu modo de atuação?
   A. Eles são incorporados em quilomícrons no lugar do colesterol.
   B. Eles competem com o colesterol pela esterificação no lúmen intestinal, de modo que menos colesterol é esterificado.
   C. Eles competem com o colesterol pela esterificação nas células da mucosa e o colesterol não esterificado é transportado ativamente da célula para o lúmen intestinal.
   D. Eles competem com o colesterol pela esterificação nas células da mucosa e o colesterol não esterificado não é incorporado em quilomícrons.
   E. Eles removem o colesterol das micelas de lipídeos de modo que ele não se encontra disponível para absorção.

6. Qual das seguintes opções sobre metabolismo energético está CORRETA?
   A. O tecido adiposo não contribui para a taxa metabólica basal (TMB).
   B. O nível de atividade física (PAL) é o somatório das razões de diferentes atividades físicas ao longo do dia, multiplicado pelo tempo gasto em cada atividade, expresso como um múltiplo de TMB.
   C. A razão de atividade física (PAR) é o custo energético de atividade física ao longo do dia.
   D. A taxa metabólica em repouso (TMR) é o gasto energético do corpo durante o sono.
   E. O custo energético da atividade física pode ser determinado pela medida do quociente respiratório (RQ) durante a atividade.

7. Qual das seguintes opções sobre o equilíbrio de nitrogênio está CORRETA?
   A. Se o consumo de proteínas for maior do que o necessário, sempre haverá equilíbrio de nitrogênio positivo.
   B. No equilíbrio de nitrogênio, a excreção de metabólitos nitrogenados é maior do que o consumo de compostos nitrogenados na dieta.
   C. No equilíbrio positivo de nitrogênio, a excreção de metabólitos nitrogenados é menor do que o consumo de compostos nitrogenados na dieta.
   D. O equilíbrio de nitrogênio é a razão entre o consumo de compostos nitrogenados e a eliminação de metabólitos nitrogenados do corpo.
   E. Equilíbrio positivo de nitrogênio significa que há uma perda resultante de proteínas do corpo.

8. Qual das seguintes vitaminas fornece o cofator para as reações de redução na síntese de ácidos graxos?
   A. Folato
   B. Niacina
   C. Riboflavina
   D. Tiamina
   E. Vitamina B_6

9. Qual das seguintes vitaminas fornece o cofator para a transaminação de aminoácidos?
   A. Folato
   B. Niacina
   C. Riboflavina
   D. Tiamina
   E. Vitamina B_6

10. Qual das seguintes vitaminas fornece o cofator para a transferência das unidades de um carbono?
   A. Folato
   B. Niacina
   C. Riboflavina
   D. Tiamina
   E. Vitamina B_6

11. Qual das seguintes vitaminas é essencial para a síntese de ácidos graxos?
   A. Biotina
   B. Folato
   C. Vitamina B_6
   D. Vitamina B_{12}
   E. Vitamina C

12. Qual das seguintes vitaminas está envolvida na homeostase do cálcio?
   A. Vitamina B_{12}
   B. Vitamina B_6
   C. Vitamina D
   D. Vitamina E
   E. Vitamina K

13. Qual das seguintes vitaminas está envolvida na coagulação sanguínea?
   A. Vitamina B_6
   B. Vitamina B_{12}
   C. Vitamina D
   D. Vitamina E
   E. Vitamina K

14. Deficiência de qual das seguintes vitaminas pode levar à anemia megaloblástica?
   A. Vitamina B_6
   B. Vitamina B_{12}
   C. Vitamina D
   D. Vitamina E
   E. Vitamina K

15. Qual das seguintes vitaminas pode mascarar a anemia por deficiência de vitamina B_{12}?
   A. Biotina
   B. Folato
   C. Riboflavina
   D. Tiamina
   E. Vitamina B_6

16. Deficiência de qual das seguintes vitaminas pode levar à anemia hemolítica?
   A. Vitamina B_6
   B. Vitamina B_{12}
   C. Vitamina D
   D. Vitamina E
   E. Vitamina K

17. Deficiência de qual das seguintes vitaminas é a principal causa de cegueira em todo o mundo?
   A. Vitamina A
   B. Vitamina B_{12}
   C. Vitamina B_6
   D. Vitamina D
   E. Vitamina K

18. Qual das seguintes opções NÃO é uma fonte de radicais de oxigênio?
   A. Ação da superóxido dismutase
   B. Ativação dos macrófagos
   C. Reações não enzimáticas dos íons de metais de transição
   D. Reações do β-caroteno com o oxigênio
   E. Radiação ultravioleta

19. Qual das seguintes afirmações NÃO é o resultado da ação de radicais de oxigênio?
   A. Ativação de macrófagos
   B. Modificação das bases no DNA
   C. Oxidação de aminoácidos em apoproteínas de LDL
   D. Peroxidação dos ácidos graxos insaturados em membranas
   E. Quebras de fita no DNA

20. Evidências epidemiológicas e estudos laboratoriais sugerem que nutrientes antioxidantes tais como as vitaminas C e E e o β-caroteno são protetores contra aterosclerose e alguns cânceres. Entretanto, estudos de intervenção com suplementos antioxidantes forneceram resultados desapontadores e em muitos casos houve mais mortes de doença coronariana e câncer no grupo de intervenção do que naqueles recebendo o placebo. Qual das seguintes opções melhor explica esse paradoxo?
   A. Antioxidantes são lipossolúveis e, portanto, não podem atuar no citosol ou no líquido extracelular.
   B. Antioxidantes formam radicais estáveis que penetram mais profundamente nos tecidos, causando mais danos.
   C. Antioxidantes formam radicais estáveis que interrompem a reação em cadeia dos radicais.
   D. As doses de antioxidantes foram em geral muito baixas para que quaisquer de seus efeitos benéficos pudessem ser vistos.
   E. Estudos de intervenção foram em geral de duração muito curta para que quaisquer efeitos benéficos pudessem ser vistos.

21. Selecione a única opção FALSA:
   A. A glicosilação ocorre apenas no aparelho de Golgi.
   B. Não há diferenças estruturais entre ribossomos livres e ligados.
   C. As proteínas destinadas à membrana plasmática e à secreção são geralmente sintetizadas nos polirribossomos envolvidos por membrana.
   D. A força próton-motora através da membrana mitocondrial interna é derivada do potencial elétrico e do gradiente de pH.
   E. Certas proteínas pancreáticas destinadas à exportação são transportadas em vesículas secretoras.

22. Selecione a única opção FALSA:
   A. A grande maioria das proteínas mitocondriais é codificada pelo genoma nuclear.
   B. Proteínas Ran, assim como as proteínas ARF e Ras, são GTPases monoméricas.

C. Uma causa da doença de Refsum é a presença de mutações nos genes que codificam as proteínas peroxissomais.
D. As proteínas peroxissomais são sintetizadas nos polirribossomos citosólicos.
E. A importação de proteínas para as mitocôndrias envolve proteínas conhecidas como importinas.

23. Selecione a única opção FALSA:
A. Peptídeos de sinalização N-terminais direcionando proteínas nascentes para a membrana do RE contêm uma sequência hidrofóbica.
B. A translocação de proteínas pós-tradução para o RE não ocorre em espécies de mamíferos.
C. A SRP contém um tipo de RNA.
D. A N-glicosilação é catalisada pelo oligossacarídeo:proteína transferase.
E. As proteínas de membrana do tipo I têm seus terminais N voltados para o lúmen do RE.

24. Selecione a opção FALSA:
A. As chaperonas frequentemente exibem atividade de ATPase.
B. A proteína dissulfeto isomerase e a peptil-prolil-isomerase são enzimas envolvidas no auxílio a proteínas para que sobrem adequadamente.
C. A ubiquitina é uma pequena proteína envolvida na degradação de proteínas pelos lisossomos.
D. As mitocôndrias contêm chaperonas.
E. A retrotranslocação através da membrana do RE está envolvida no auxílio para dispor as proteínas dobradas erroneamente.

25. Selecione a opção FALSA:
A. A Rab é uma pequena GTPase envolvida na marcação de vesículas.
B. Vesículas COPII estão envolvidas no transporte anterógrado de substâncias do RE para o ERGIC ou aparelho de Golgi.
C. A brefeldina A impede o GTP de se ligar a ARF e, portanto, inibe a formação de vesículas COPI.
D. A toxina botulínica B atua clivando a sinaptobrevina, inibindo a liberação de acetilcolina na junção neuromuscular.
E. A furina converte pré-pró-albumina em pró-albumina.

26. Todas as seguintes opções são glicoproteínas, EXCETO:
A. Colágeno
B. TSH
C. Albumina
D. IgG
E. Transferrina

27. Todos os seguintes açúcares são encontrados em glicoproteínas, EXCETO:
A. Frutose
B. Fucose
C. Galactose
D. Manose
E. Xilose

28. Selecione a única opção FALSA:
A. As mucinas contêm predominantemente glicanos O-ligados.
B. Cadeias de açúcares O-ligadas são construídas pela doação em etapas de açúcares dos nucleotídeos.
C. O oligossacarídeo dolicol-pirofosfato doa todos os açúcares encontrados nas glicoproteínas N-ligadas maduras.
D. O ácido N-acetil-neuramínico é comumente encontrado nos terminais das cadeias de açúcares N-ligadas.
E. A calnexina retém as proteínas dobradas parcialmente ou erroneamente no RE até que o dobramento correto tenha ocorrido.

29. Selecione a única opção FALSA:
A. A glicose pode se ligar a proteínas por meio de uma reação não enzimática para formar uma base Schiff.
B. Os produtos finais da glicação anormal desempenham um importante papel no dano tecidual que ocorre no diabetes melito.
C. A hemoglobina ocorre apenas em indivíduos com diabetes melito.
D. A glipiação anormal está envolvida na etiologia na hemoglobinúria paroxística noturna.
E. A ligação de *P. falciparum* a algumas células humanas é mediada por uma estrutura GPI na superfície do parasita.

30. Selecione a única opção FALSA:
A. A ligação inicial dos neutrófilos às células endoteliais de pequenos vasos sanguíneos na inflamação aguda envolve interações entre a L-selectina e glicoproteínas das células endoteliais.
B. A doença da célula I se deve a mutações no gene que codifica uma GalNAc fosfotransferase.
C. A ligação do vírus da gripe aviária às células humanas envolve uma interação entre hemaglutininas e o ácido N-acetil-neuramínico da superfície das células.
D. O HIV-1 se liga às células humanas por meio de uma glicoproteína (gp120) presente na sua superfície.
E. A *H. pilori* se liga às células humanas por meio de uma interação entre a adesina e os glicanos da superfície celular.

31. Selecione a única opção FALSA:
A. O colágeno tem uma estrutura de tripla-hélice, formando uma super-hélice voltada para a direita.
B. A prolina e a hidroxiprolina conferem rigidez ao colágeno.
C. O colágeno contém uma ou mais ligações O-glicosídicas.
D. O colágeno não possui ligações cruzadas.
E. A deficiência de vitamina C impede a ação da prolil e da lisil hidroxilases.

32. Selecione a única opção FALSA:
A. A elastina contém hidroxiprolina, mas não hidroxilisina.
B. A elastina contém ligações cruzadas formadas por desmosinas.
C. Nenhuma doença genética devido a anormalidades da elastina foi até agora identificada.
D. Ao contrário do colágeno, há apenas um único gene codificando a elastina.
E. A elastina não contém quaisquer moléculas de açúcares.

33. Selecione a única opção FALSA:
A. A síndrome de Marfan é causada por mutações no gene que codifica a fibrilina-1, um componente importante das microfibrilas.
B. Todos os casos da síndrome de Ehlers-Danlos são causados por mutações que afetam os genes que codificam os vários tipos de colágeno.

C. A laminina é encontrada nos glomérulos renais junto com a entactina, o colágeno tipo IV e a heparina ou o heparan sulfato.
D. Mutações que afetam o colágeno tipo IV podem causar doença renal séria.
E. Mutações no gene *1A1* do colágeno podem causar *osteogenesis imperfecta*.

34. Selecione a única opção FALSA:
A. A maioria, mas não todos os GAG, contém um açúcar aminado e um ácido urônico.
B. Todos os GAG são sulfatados.
C. Os GAG são formados a partir das ações de glicosiltransferases usando açúcares fornecidos por nucleotídeos.
D. O ácido glicurônico pode ser convertido em ácido idurônico por uma epimerase.
E. O proteoglicano agrecano contém ácido hialurônico, queratan sulfato e condroitina sulfato.

35. Um recém-nascido do sexo masculino não consegue se desenvolver e, ao ser examinado, é diagnosticado com hepatomegalia e esplenomegalia, entre outros achados. A análise da urina revela a presença tanto de dermatan sulfato quanto de heparan sulfato. Você suspeita que o paciente tenha a síndrome de Hurler. A partir da lista a seguir, selecione a enzima que você gostaria de ter testado para apoiar o seu diagnóstico:
A. β-glucuronidase.
B. β-galactosidase.
C. α-L-iduronidase
D. α-N-acetilglicosaminidase
E. Neuraminidase

36. Você vê uma criança no ambulatório que se encontra bem abaixo da altura média. Você percebe que a criança tem membros curtos, tronco de tamanho normal, macrocefalia e várias outras anormalidades esqueléticas. Você suspeita que a criança tenha acondroplasia. Selecione a partir da lista a seguir o teste que melhor confirmaria o seu diagnóstico:
A. Medição do nível do hormônio de crescimento.
B. Ensaios para enzimas envolvidas no metabolismo de GAG.
C. Testes para os mucopolissacarídeos urinários.
D. Testes genéticos para anormalidades do receptor 3 do fator de crescimento dos fibroblastos.
E. Testes genéticos para anormalidades do hormônio de crescimento.

37. Em relação às proteínas do músculo, escolha a única opção FALSA:
A. A actina é um constituinte importante dos filamentos finos.
B. A F-actina pode se polimerizar sob condições fisiológicas em G-actina.
C. A região da cabeça da miosina-II, o principal componente dos filamentos grossos, tem atividade de ATPase.
D. A tropomiosina é um importante componente dos filamentos grossos.
E. A F-actina em grande parte promove a liberação de ADP e P_i da miosina ATPase.

38. Em relação ao processo da contração muscular, selecione a única opção FALSA:
A. A ligação do Ca^{2+} à troponina C expõe os sítios de ligação da actina à miosina, permitindo que ambas interajam.
B. A liberação do P_i do complexo actina-miosina-ADP-P_i inicia o movimento de força.
C. A liberação de ADP do complexo actina-miosina-ADP é acompanhada por uma grande mudança conformacional na cabeça de miosina em relação à sua cauda.
D. A miosina-ATP tem uma grande afinidade pela actina.
E. Se os níveis de ATP são baixos, o *rigor mortis* pode se seguir devido ao bloqueio da liberação da actina do complexo actina-miosina.

39. Durante a anestesia usando halotano você observa que a temperatura do seu paciente está aumentando rapidamente e você suspeita de hipertermia maligna (MH). Selecione a única opção FALSA:
A. A MH pode se dever a mutações afetando o canal de liberação de Ca^{2+} (RYR).
B. A MH pode se dever a mutações afetando a Na^{+}-K^{+}-ATPase.
C. A MH também pode se dever a mutações afetando o receptor de di-hidropiridina, um canal de K lento dependente de voltagem do tipo canal de Ca^{2+}.
D. Uma concentração intracelular alta de Ca^{2+}, causando rigidez dos músculos, é encontrado na MH.
E. O tratamento adequado de Mh é a administração i.v. de dantroleno para inibir a liberação de Ca do SR para o citosol.

40. Em relação aos diferentes tipos de músculos, selecione a única opção FALSA:
A. O músculo esquelético não apresenta caldesmona.
B. Músculos cardíacos não apresentam o sistema troponina.
C. A concentração de Ca^{2+} extracelular é importante para a contração dos músculos cardíaco e liso.
D. O músculo liso exibe baixa ciclagem de pontes cruzadas, permitindo a contração prolongada.
E. Os músculos esquelético, cardíaco e liso apresentam o sistema actina-miosina.

41. Selecione a única opção FALSA relacionada ao óxido nítrico (NO):
A. O NO atua como um vasodilatador.
B. O NO pode ser formado a partir de um aminoácido particular por meio da ação da NO sintase.
C. O NO ativa a adenil-ciclase e o AMPc resultante inibe a ação de certas proteínas quinases, provocando o relaxamento muscular.
D. O NO pode inibir a agregação plaquetária.
E. O NO tem uma meia-vida muito pequena nos tecidos e pode levar à geração de radicais OH.

42. Selecione a única opção FALSA:
A. As fibras musculares tipo I contêm mioglobina e mitocôndrias; seu metabolismo é predominantemente aeróbio.
B. As fibras musculares tipo II derivam sua energia predominantemente da glicólise anaeróbia.
C. As quantidades de fibras musculares tipo I e tipo II podem ser alteradas por meio do treinamento.
D. Em uma maratona, a glicose do sangue e os ácidos graxos livres são as principais fontes energéticas.
E. Em um tiro de 100 m, a glicose anaeróbia é a única fonte de energia.

43. Selecione a única opção FALSA:
    A. Os microfilamentos são compostos por actina e miosina.
    B. Os microtúbulos contêm tubulinas α e β; os fármacos colchicina e vimblastina se ligam aos microtúbulos e inibem a sua formação.
    C. Filamentos intermediários incluem laminas e queratinas.
    D. Mutações que afetam as queratinas são uma das causas da formação de bolhas.
    E. Mutações mo gene codificador da A e da C causam progéria (envelhecimento acelerado).

44. Selecione a única opção FALSA:
    A. Muitas das proteínas plasmáticas, mas não todas, são sintetizadas nos hepatócitos.
    B. A haptoglobina é uma glicoproteína de fase aguda que se liga à hemoglobina no plasma e a impede de entrar nos rins.
    C. Muitas proteínas plasmáticas, tais como a haptoglobina, a transferrina e a α1-antitripsina, exibem polimorfismos.
    D. A proteína C-reativa (CRP) é um biomarcador para vários estados inflamatórios.
    E. A NFkB é uma proteína de fase aguda cujo nível plasmático é elevado na inflamação aguda.

45. Selecione a única opção FALSA:
    A. A albumina é sintetizada como uma pré-pró-proteína.
    B. A albumina é a principal proteína plasmática em termos de massa; ela não é uma proteína de fase aguda.
    C. Indivíduos com analbuminemia apresentam edema grave.
    D. A albumina se liga a vários ligantes, tais como a bilirrubina, ácidos graxos livres, cobre e certos fármacos.
    E. A meia-vida plasmática da albumina pode ser acentuadamente reduzida nas gastroenteropatias severas.

46. Selecione a única opção FALSA:
    A. A transferrina transporta o ferro no estado férrico pela circulação.
    B. O ferro é absorvido no duodeno no estado ferroso; um citocromo b duodenal reduz o ferro no estado férrico ao estado ferroso.
    C. No interior dos enterócitos, a hefaestina oxida o ferro no estado ferroso a ferro no estado férrico e o último é então transferido ao plasma pela ação da ferroportina.
    D. A transferrina se liga ao receptor de transferrina 1 (TfR1), é captada por endocitose mediada por receptor e é então degradada no interior dos endossomos.
    E. Exceto durante a inflamação, os níveis de ferritina no plasma são geralmente indicadores das reservas de ferro do corpo.

47. Selecione a única opção FALSA:
    A. Quando os níveis intracelulares de ferro estão altos, a ferritina não é sintetizada, mas o TfR1 é.
    B. A hepcidina diminui a absorção de ferro no intestino por meio da ligação da ferroportina e do disparo da sua degradação.
    C. A proteína HFE pode influenciar o metabolismo de ferro pela regulação para cima da expressão da hepcidina.
    D. Os níveis da proteína morfogenética 6 do osso podem afetar também a regulação da expressão da hepcidina.
    E. A ceruplasmina, uma proteína plasmática que se liga ao cobre, desempenha um importante papel no metabolismo do ferro por meio da oxidação do ferro do estado ferroso ao estado férrico.

48. Você encontra uma mulher de 50 anos de idade no ambulatório que está pálida e cansada. Você suspeita que ela tenha anemia por deficiência de ferro. Você solicita vários exames laboratoriais, como apresentado a seguir. Qual resultado NÃO é consistente com seu diagnóstico provisório?
    A. Baixos níveis de ferritina plasmática.
    B. Redução de saturação da transferrina.
    C. Diminuição do nível de hemoglobina.
    D. Diminuição do nível de protoporfirina nas hemácias.
    E. Aumento do TfR solúvel no soro.

49. Você encontra um homem de 57 anos de idade no ambulatório que apresenta um anel pigmentado verde em torno de sua córnea e também alguns sinais de transtorno neurológico. Você suspeita que ele apresente a doença de Wilson. Selecione a única opção FALSA em relação a essa condição:
    A. O cobre se acumula no fígado e no cérebro.
    B. Ela é causada por mutações na ATPase de tipo P que se liga ao cobre, que está envolvida na doença de Menkes.
    C. Há um aumento de cobre na membrana de Descemet.
    D. Os níveis de ceruplasmina são geralmente baixos.
    E. A condição responde ao tratamento com penicilamina, o qual quela o cobre e o remove do corpo na urina.

50. Em relação à amiloidose, selecione a única opção FALSA:
    A. Pode ser causada por um defeito na amilase.
    B. Pode ser causada pela deposição de fragmentos da cadeia leve das imunoglobulinas.
    C. Pode ser causada pelo acúmulo de produtos de degradação do amiloide sérico A.
    D. Pode ser causada pelo acúmulo de proteínas plasmáticas mutantes tais como a transtiretina.
    E. Pode ser causada pelo acúmulo de β_2-microglobulina.

51. Selecione a única opção FALSA:
    A. A maioria das mas não todas as imunoglobulinas são glicoproteínas.
    B. Todas as imunoglobulinas contêm no mínimo duas cadeias leves e duas pesadas.
    C. O tipo de cadeia pesada que uma imunoglobulina contém determina a sua classe.
    D. As regiões hipervariáveis das imunoglobulinas envolvem sítios de ligação a antígenos e determinam a especificidade das imunoglobulinas.
    E. As regiões constantes das imunoglobulinas determinam as funções efetoras específicas de cada classe, tais como a fixação do complemento e a passagem transplacental.

52. Selecione a única opção FALSA:
    A. A diversidade de junções reflete a adição ou deleção de um número aleatório de nucleotídeos quando certos segmentos gênicos de anticorpos são reunidos.
    B. Em resposta a um imunógeno, as moléculas de IgM normalmente precedem o aparecimento de moléculas IgG no plasma; isto é conhecido como mudança de classe.
    C. As proteínas de Bence-Jones são cadeias pesadas de imunoglobulinas que são produzidas em excesso no mieloma múltiplo.
    D. A humanização dos anticorpos monoclonais envolve a ligação de regiões determinantes de complementaridade a sítios apropriados na molécula de imunoglobulina humana, diminuindo, assim, a imunogeneticidade.

E. O sistema complemento consiste em aproximadamente 20 proteínas e está envolvido na lise celular, inflamação e depuração dos complexos antígeno-anticorpo da circulação.

53. Qual das seguintes opções relacionadas às vias de coagulação sanguínea NÃO ESTÁ CORRETA?
    A. Os componentes do complexo Xase (tenase) extrínseco são o fator VIIa, o fator tecidual, Ca^{2+} e o fator X.
    B. Os componentes do complexo Xase (tenase) intrínseco são o fator IXa, fator VIIIa, Ca^{2+} e o fator X.
    C. Os componentes do complexo da protrombinase são o fator Xa, o fator Va, Ca^{2+} e o fator II (protrombina).
    D. Os complexos Xase intrínseco e extrínseco e o complexo da protrombinase precisam de fosfatidilserina procoagulante aniônica no LDL (lipoproteína de baixa densidade) para sua formação.
    E. A fibrina formada pela clivagem de fibrinogênio pela trombina é covalentemente ligada transversalmente pela ação do fator XIIIa, o qual é formado pela ação da trombina no fator XIII.

54. Em qual dos seguintes fatores de coagulação um paciente que toma varfarina para seu distúrbio trombótico apresenta diminuição de resíduos de Gla (γ-carboxiglutamato)?
    A. Fator tecidual
    B. Fator XI
    C. Fator V
    D. Fator II (protrombina)
    E. Fibrinogênio

55. Um homem de 65 anos de idade sofre um infarto do miocárdio e recebe o ativador do plasminogênio tecidual em no máximo 6 h após o início da trombose para obter qual dos seguintes resultados?
    A. Impedir a ativação da via extrínseca da coagulação.
    B. Inibir a trombina.
    C. Estimular a degradação dos fatores VIIIa e Va.
    D. Estimular a fibrinólise.
    E. Inibir a agregação plaquetária.

56. Qual das seguintes opções sobre a ativação plaquetária na hemostase e trombose NÃO ESTÁ CORRETA?
    A. As plaquetas aderem diretamente ao colágeno subendotelial por meio da GPIa-IIa e GPVI, enquanto a ligação da GPIb-IX-V é mediada por meio do fator de Willebrand.
    B. O agente agregador tromboxano A_2 é formado a partir do ácido araquidônico liberado dos fosfolipídeos da membrana plaquetária pela ação da fosfolipase A_2.
    C. O agente agregador ADP é liberado dos grânulos densos das plaquetas ativadas.
    D. O agente agregador trombina ativa a fosfolipase Cβ intracellular, que forma as moléculas efetoras internas 1,2-diacilglicerol e 1,4,5-inositol trifosfato a partir do fosfolipídeo de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.
    E. Os receptores de ADP, o receptor A_2 de tromboxano, os receptores PAR-1 e PAR-4 de trombina e o receptor de fibrinogênio GPIIb-IIIa são exemplos de receptores acoplados à proteína G.

57. Uma menina de 15 anos de idade chega ao ambulatório com feridas nas suas extremidades inferiores. Das doenças a seguir, qual é *menos provável* para explicar os sinais de sangramento encontrados nesse paciente?
    A. Hemofilia A
    B. Doença de von Willebrand
    C. Uma baixa contagem de plaquetas
    D. Ingestão de aspirina
    E. Um distúrbio plaquetário com ausência de grânulos de armazenamento.

58. Selecione a única opção FALSA:
    A. As α-talassemias se devem a mutações que afetam as cadeias alfa da hemoglobina.
    B. A deficiência de ácido fólico ou de vitamina B_{12} provocam a anemia megaloblástica.
    C. A esferocitose hereditária se deve a mutações que afetam certas proteínas de membrana de hemácias.
    D. A hemoglobinúria paroxística noturna (PNH) se deve a mutações que afeta, a síntese de proteínas ancoradas ao GPI na membrana das hemácias.
    E. Mutações no gene da piruvato-quinase também causam PNH.

59. Selecione a única opção FALSA:
    A. A hemácia é altamente dependente de glicose para o seu metabolismo.
    B. A hemácia tem um transportador de glicose (GLUT1) que possui 12 segmentos helicais transmembrana.
    C. A hemácia tem uma via das pentoses-fosfato que gera NADPH.
    D. A hemácia tem um ciclo do ácido cítrico ativo.
    E. A hemácia contém certas enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos, cuja deficiência pode causar anemia hemolítica.

60. Em relação à anemia devida à deficiência da G-6-desidrogenase, selecione a única opção FALSA:
    A. Ela ocorre muito frequentemente em várias partes do mundo devido a mutações no gene que codifica a enzima.
    B. Trata-se de uma anemia hemolítica e, dependendo da gravidade, os níveis de bilirrubina conjugada são geralmente elevados, bem como os de haptoglobinas (Hp).
    C. As formas mutantes da enzima não produzem NADPH em níveis normais.
    D. Os níveis de glutationa reduzida (GSH) são baixos em hemácias afetadas, porque o NADPH é necessário para regenerar GSH a partir de glutationa oxidada (GSSG).
    E. Feijões fava, devido ao seu conteúdo de oxidantes potenciais, podem precipitar um ataque, bem como certos fármacos como a primaquina (um antimalárico).

61. Todas as seguintes proteínas estão presentes na membrana das hemácias, EXCETO:
    A. Piruvato-quinase
    B. Espectrina
    C. Anquirina
    D. Glicoforina
    E. Proteína trocadora de ânions

62. Em relação às substâncias do grupo sanguíneo ABO, selecione a única opção FALSA:
    A. Elas podem ser ou glicoesfingolipídeos ou glicoproteínas, dependendo da localização.
    B. Indivíduos com o grupo sanguíneo AB têm anticorpos para as substâncias dos grupos A e B.

C. A substância do grupo sanguíneo H é formada a partir do seu precursor pela ação da fucosiltransferase.
D. O grupo sanguíneo B é formado a partir do seu precursor pela ação da galactosiltransferase.
E. Os indivíduos do grupo sanguíneo O não apresentam a galactosiltransferase.

63. Em relação aos vários leucócitos, selecione a única opção FALSA:
A. Os neutrófilos possuem integrinas que estão envolvidas na sua adesão às células endoteliais.
B. Uma deficiência de uma subunidade comum a várias integrinas afeta a habilidade dos neutrófilos de se ligarem às células endoteliais e resulta em um tipo doença de deficiência de adesão de leucócitos.
C. A lisozima, que é abundante em macrófagos, hidrolisa a ligação entre o ácido N-acetil-neuramínico e a N-acetil-D-glicosamina encontrada em nas paredes celulares de certas bactérias, causando lise.
D. A lactoferrina é uma proteína sintetizada por neutrófilos que se liga ao ferro, que pode inibir o crescimento de certas bactérias.
E. A mieloperoxidase pode produzir ácido hipocloroso; essa enzima é responsável pela cor verde do pus.

64. Selecione a única opção FALSA:
A. A NADPH oxidase é inativa em células fagocíticas em repouso.
B. A forma ativa de NADPH oxidase contém o citocromo P450 e pelo menos outros dois polipeptídeos.
C. A oxidase pode ser ativada quando as células fagocíticas entrarem em contato com vários ligantes.
D. A ativação da oxidase leva à produção de superóxido a partir do oxigênio molecular, um fenômeno conhecido como explosão respiratória.
E. Pacientes com mutações em quaisquer dos polipeptídeos presentes na enzima ativa não produzem superóxido suficiente para matar as bactérias e os fungos invasores e são suscetíveis a infecções recorrentes (doença granulomatosa crônica).

65. Selecione a única opção FALSA:
A. O citocromo P450 é uma hemoproteína presente em altas concentrações no RE do fígado que desempenha um papel essencial no metabolismo xenobiótico e de fármacos.
B. A principal reação catalisada pela enzima é a hidroxilação de um grande número de substratos diferentes.
C. Usa o NADPH e requer a redutase do NADPH-citocromo P450 para entrar em atividade.
D. A reação catalisada pelo citocromo P450 produz quantidades estequiométricas de superóxido.
E. A enzima é induzível por vários fármacos, um fato que pode demandar a mudança de dose de outros fármacos que estejam sendo administrados simultaneamente.

66. As reações da fase 2 incluem todas as seguintes reações, EXCETO:
A. Hidroxilação
B. Glicuronidação
C. Sulfatação
D. Metilação
E. Acetilação

67. Selecione a única opção FALSA:
A. A glutationa (GSH) é um dipeptídeo derivado do ácido glutâmico e da cisteína.
B. A GSH reduzida pode ser conjugada a várias moléculas eletrofílicas tóxicas, reduzindo, assim, a sua toxicidade.
C. O metabolismo dos conjugados de glutationa pode levar à produção e subsequente excreção urinária de ácidos mercaptúricos.
D. A GSH ajuda a manter os grupos SH de certas proteínas em seu estado reduzido.
E. A GSH participa do transporte de certos aminoácidos através da membrana plasmática das células em uma reação catalisada pela γ-glutamiltransferase.

68. Qual das seguintes opções NÃO é uma característica da hipótese mitocondrial do envelhecimento?
A. Espécies reativas de oxigênio são geradas como um subproduto da cadeia transportadora de elétrons.
B. As mitocôndrias não têm a capacidade de reparar DNA danificado.
C. Muitos dos complexos na cadeia transportadora de elétrons são construídos a partir de uma mistura de subunidades codificadas pelo genoma nuclear e pelo genoma mitocondrial.
D. Mitocôndrias danificadas formam agregados resistentes a proteases.
E. Mitocôndrias danificadas podem disparar apoptose (morte celular programada).

69. Qual das seguintes opções NÃO é um componente do repertório celular de agentes de reparo e prevenção?
A. Superóxido dismutase
B. Caspase 7
C. Glutationa
D. Isoaspartil metiltransferase
E. Catalase

70. O(s) componente(s) celular(es) que é(são) mais vulnerável(eis), em termos tanto de suscetibilidade quanto de consequências em potencial é/são:
A. Fosfolipídeos de membrana
B. Dímeros de timina
C. Cadeias laterais de timina
D. Cadeia transportadora de elétrons
E. DNA

71. Qual das seguintes opções é um elemento da teoria metabólica do envelhecimento?
A. Grandes animais em geral vivem mais porque, estatisticamente falando, seus cromossomos maiores podem adsorver mais dano antes de sofrer uma mutação.
B. Dietas restritas caloricamente tendem a aumentar a duração da vida porque a atividade metabólica deve diminuir quando a disponibilidade de nutrientes é limitada.
C. O coração é o órgão mais essencial para a vida.
D. O danos por espécies reativas de oxigênio é multiplicado por sua tendência em participar das reações em cadeia.
E. Os batimentos cardíacos são medidos por meio do progressivo encurtamento dos telômeros.

72. Em relação à carcinogênese química, selecione a única opção FALSA:
    A. Aproximadamente 80% dos cânceres humanos podem ser devidos a fatores ambientais.
    B. Em geral, substâncias químicas carcinogênicas interagem não covalentemente com o DNA.
    C. Algumas substâncias químicas são convertidas em carcinogênicos por enzimas, em geral espécies de citocromo P450.
    D. Os carcinógenos mais recentes são eletrófilos e atacam grupos nucleofílicos no DNA.
    E. O teste de Ames é um teste útil para detectar substâncias químicas para mutagenicidade; entretanto, testes em animais são necessários para demonstrar que uma substância química é carcinogênica.

73. Em relação à carcinogênese viral, selecione a única opção FALSA:
    A. Aproximadamente 15% dos cânceres humanos podem ser causados por vírus.
    B. Apenas vírus de RNA são carcinogênicos.
    C. Os vírus de RNA causando ou sendo associados a tumores incluem o vírus da hepatite C.
    D. Os retrovírus possuem transcriptase reversa, a qual copia RNA para DNA.
    E. Vírus tumorais atuam desregulando o ciclo celular, inibindo a apoptose e interferindo nos processos de sinalização celular.

74. Em relação aos oncogenes e genes supressores de tumores, selecione a única opção FALSA:
    A. Ambas as cópias de um gene supressor de tumor devem sofrer mutações para que seu produto perca sua atividade.
    B. A mutação de um oncogene ocorre em células somáticas e não é herdada.
    C. O produto de um oncogene apresenta um ganho de função que sinaliza a divisão celular.
    D. *RB* e *P53* são genes supressores de tumores; *MYC* e *RAS* são oncogenes.
    E. A mutação de um gene supressor de tumor ou um oncogene é suficiente para causar câncer.

75. Em relação aos fatores de crescimento, selecione a única opção FALSA:
    A. Eles incluem um grande número de polipeptídeos, a maioria dos quais estimula o crescimento celular.
    B. Fatores de crescimento podem atuar de modo endócrino, parácrino ou autócrino.
    C. Certos fatores de crescimento, tais como o TGF-β, podem atuar de um modo inibidor do crescimento.
    D. Alguns receptores para os fatores de crescimento têm atividade de tirosina-quinase; mutações desses receptores ocorrem em células cancerosas.
    E. O PDGF estimula a fosfolipase A_2, que hidroliza PIP_2, para formar DAG e IP_3, ambos mensageiros secundários.

76. Em relação ao ciclo celular, selecione a única opção FALSA:
    A. O ciclo celular tem quatro fases (G_1, S, G_2 e M).
    B. As células cancerosas em geral têm um tempo de geração mais curto do que as células normais e há menor número delas na fase G_0.
    C. Várias mutações nas ciclinas e CDKs foram registradas em células cancerosas.
    D. RB é um regulador do ciclo celular; ele se liga ao fator de transcrição E2F, permitindo, assim, a progressão da célula da fase G_1 à S.
    E. Quando ocorre dano ao DNA, o P53 aumenta em quantidade e ativa a transcrição de genes que retardam a passagem pelo ciclo.

77. Em relação aos cromossomos e à instabilidade genômica, selecione a única opção FALSA:
    A. As células cancerosas podem ter um fenótipo mutante, implicando mutações nos genes que afetam a replicação e o reparo do DNA, a segregação cromossômica, a vigilância de danos ao DNA e a apoptose.
    B. A instabilidade cromossômica se refere ao ganho ou à perda de cromossomos causados por anormalidades da segregação cromossômica durante a mitose.
    C. A instabilidade dos microssatélites envolve a expansão ou contração de microssatélites devido a anormalidades do reparo por excisão de nucleotídeos.
    D. A aneuploidia (quando o número cromossômico de uma célula não é um múltiplo do número haploide) é uma característica das células tumorais.
    E. Anormalidades da coesão cromossômica e da ligação cinetócoro-microtúbulos podem contribuir para a instabilidade dos cromossomos e aneuploidia.

78. Selecione a única opção FALSA:
    A. A atividade da telomerase é frequentemente aumentada nas células cancerosas.
    B. Vários cânceres têm uma predisposição hereditária, incluindo a síndrome de Li-Fraumeni e o retinoblastoma.
    C. Os produtos de *BRCA1 e BRCA2* (responsáveis pelo câncer mamário hereditário dos tipos I e II) parecem estar envolvidos no reparo de DNA.
    D. As células tumorais em geral apresentam uma alta taxa de glicólise anaeróbia; isto pode ser ao menos parcialmente explicado pela presença em várias células tumorais da isozima PK-2, que é associada à menor produção de ATP e possivelmente ao aumento do uso de metabólitos para a produção de biomassa.
    E. O dicloroacetato, composto que desempenha alguma atividade anticancerígena, inibe a piruvato-carboxilase e, assim, afasta o piruvato da glicólise.

79. Selecione a única opção FALSA:
    A. O sequenciamento total do genoma está revelando novas informações a respeito dos números e tipos de mutações nas células cancerosas.
    B. Anormalidades dos mecanismos epigenéticos, tais como a desmetilação dos resíduos de citosina, modificação anormal de histonas e remodelagem da cromatina aberrante estão sendo crescentemente detectados em células cancerosas.
    C. A persistência de células-tronco cancerosas (que são relativamente dormentes e que têm sistemas de reparo de DNA ativos) podem ajudar a explicar algumas das deficiências da quimioterapia.

D. A angiogenina é um estimulador potente da angiogênese.
E. A inflamação crônica, possivelmente por meio do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, predispõe ao desenvolvimento de certos tipos de cânceres.

80. Em relação à apoptose, selecione a única opção FALSA:
A. A apoptose pode ser iniciada pela interação de certos ligantes a receptores específicos na superfície celular.
B. O estresse celular e outros fatores ativam a via mitocondrial da apoptose; a liberação do citocromo P450 no citoplasma é um evento importante nessa via.
C. Um padrão distinto de fragmentos de DNA é encontrado em células apoptóticas; isto é, ativado por DNase ativada por caspase.
D. A caspase 3 digere as proteínas celulares tais como a lamina, certas proteínas do citoesqueleto e várias enzimas, levando à morte celular.
E. As células cancerosas adquiriram várias mutações que as permitem evitar a apoptose, prolongando sua existência.

81. Selecione a única opção FALSA:
A. As proteínas envolvidas na adesão celular incluem as caderinas, integrinas e selectinas.
B. Quantidades menores de E-caderina nas superfícies das células cancerosas podem ajudar a explicar a diminuição de adesividade apresentada pelas células tumorais.
C. O aumento da atividade da GlcNAc transferase V em células cancerosas pode levar a um entrelaçamento alterado de glicanos na superfície celular, talvez predispondo à sua dispersão.
D. As células cancerosas secretam metaloproteinases que degradam as proteínas no ECM e facilitam sua dispersão.
E. Todas as células tumorais têm capacidade genética para colonizar.

82. Das seguintes opções, o *melhor teste* da função renal é:
A. Medida da ureia sanguínea
B. Medida das proteínas na urina
C. Depuração de creatinina
D. Medida da amônia na urina
E. Medida do volume urinário

83. Um teste que avalia a função de *síntese* do fígado é o de:
A. Níveis de albumina sérica
B. Níveis de bilirrubina conjugada (direta) sérica
C. Alanina transaminase sérica (ALT)
D. Fosfatase alcalina sérica (ALP)
E. Amônia sanguínea

84. Todas as seguintes opções são características de uma substância cuja depuração é indicativa da taxa de filtração glomerular (GFR), EXCETO:
A. Ela deve ter níveis sanguíneos estáveis.
B. Ela deve ser filtrada livremente no glomérulo.
C. Ela deve ser completamente reabsorvida pelo túbulo renal.
D. Ela não deve ser secretada pelo túbulo renal.
E. Ela não deve ser metabolizada no corpo.

85. O primeiro teste que deve ser feito na avaliação da função tireoidiana é a medição de:
A. Tireoxina total
B. Hormônio de estimulação da tireoide (TSH)
C. Tireoxina livre e tri-iodotironina
D. Hormônio liberador de tireotropina (TRH)
E. Globulina de ligação à tireoide (TBG)

86. Em relação à deficiência da adenosina desaminase (ADA), selecione a única opção FALSA:
A. A deficiência da ADA é responsável pela maioria dos casos de doença da imunodeficiência combinada severa (SCID).
B. Os níveis aumentados de dATP resultando da deficiência da ADA são tóxicos aos linfócitos T.
C. A conjugação da ADA ao polietilenoglicol (PEG) prolonga a vida na circulação da enzima.
D. A integração de um gene via terapia gênica pode, em alguns casos, causar câncer por meio da mutagênese insercional.
E. Critérios a serem satisfeitos antes da administração da terapia gênica incluem que o gene a ser administrado deva apresentar níveis suficientes de expressão, que ele seja regulado e que não haja efeitos colaterais significativos.

87. Em relação à doença de Alzheimer (DA), selecione a única OPÇÃO FALSA:
A. Apenas cerca de 10% dos casos de DA parecem ter uma base genética.
B. A deposição do peptídeo β-amiloide ($A\beta_{42}$) seguida de sua agregação após a oligomerização e formação de folhas β desempenham um papel central na etiologia da DA.
C. A $A\beta_{42}$ é derivada da proteína precursora amiloide (APP), uma proteína transmembrana; a APP é um substrato para várias proteases (secretases).
D. Os genes envolvidos na DA incluem o *APOE4*, o qual parece aumentar a deposição de $A\beta_{42}$.
E. Outra característica importante da DA é a deposição de uma forma fosforilada da tau, uma proteína associada a microtúbulos que forma emaranhados neuríticos.

88. Em relação ao cólera, selecione a única opção FALSA:
A. O cólera se deve à infecção pela bactéria *V. cholera*, que secreta uma enterotoxina.
B. A toxina colérica tem subunidades A e B; as subunidades B interagem com o gangliosídeo GM1 presente na membrana plasmática das células intestinais.
C. A subunidade A usa o NAD para ribosilar a subunidade G_s da adenilato-ciclase, regulando-a para cima e aumentando a formação de AMPc, que, por sua vez, ativa a proteína quinase A (PKA).
D. A PKA fosforila várias proteínas alvo, resultando em uma perda massiva de NaCl para o intestino.
E. A terapia para o tratamento do cólera inclui a substituição imediata do líquido perdido e a administração de um antibiótico apropriado; após, a ingestão de uma solução de reidratação (contendo glicose, cloreto de sódio, citrato de sódio e bicarbonato de sódio) foi muito eficaz.

89. Em relação ao câncer colorretal, selecione a única opção FALSA:
A. Cânceres colorretais podem surgir de pólipos adenomatosos.
B. Oncogenes específicos e genes supressores de tumores estão envolvidos na sua etiologia.
C. Fatores ambientais – tais como uma dieta rica em gorduras saturadas e baixa em fibras – também foram apontados como envolvidos na sua etiologia.

D. CEA é uma glicoproteína que é liberada no plasma a partir da superfície de membranas de certas células.
E. CEA é um teste excelente, com grande sensibilidade e alta especificidade para a detecção da presença de câncer colorretal.

90. Em relação à fibrose cística (FC), selecione a única opção FALSA:
A. A FC é uma doença genética causada por mutações no gene *CFTR*.
B. O gene *CFTR* foi descoberto devido à sua associação a uma deleção massiva característica localizada no cromossomo 7.
C. Mais de 1.000 mutações diferentes foram registradas no gene desde a sua descoberta.
D. O gene da FC codifica o transportador de cloro responsivo à AMPc; anormalidades do transportador levam à redução da secreção de cloro pelas células epiteliais e a alto conteúdo de cloro no suor.
E. Muco viscoso pode obstruir os dutos pancreáticos, levando a uma deficiência de várias enzimas digestivas no intestino, causando desnutrição, e sua presença no trato respiratório favorece o crescimento de bactérias nocivas tais como a *Pseudomonas aeruginosa*.

91. Em relação à cetoacidose diabética (DKA), selecione a única opção FALSA:
A. A superprodução de corpos cetônicos na DKA é causada pela quebra de gorduras devido à falta de insulina; ela resulta em acidose.
B. Os corpos cetônicos são o ácido β-hidroxibutírico e o ácido acetoacético.
C. O ânion *gap* (plasma $Na^+ - [Cl^- + HCO_3^-]$) é aumentado na DKA, mas também em outras condições tais como a acidose lática e a intoxicação por salicilatos.
D. Os níveis plasmáticos de K^+ são frequentemente elevados na DKA devido à ausência de insulina.
E. Tratamento inicial adequado da DKA é a administração de insulina e salina i.v.; glicose e KCl são adicionados posteriormente.

92. Em relação à distrofia muscular de Duchenne (DMD), selecione a única opção FALSA:
A. A creatina-quinase MB é uma enzima importante para avaliar o diagnóstico de DMD.
B. A DMD é uma doença degenerativa muscular ligada ao cromossomo X.
C. A proteína afetada tanto na DMD quanto na distrofia muscular de Becker é a distrofina.
D. A distrofina é uma proteína muito grande associada ao sarcolema do músculo.
E. Mutações que afetam as proteínas musculares codificadas por vários genes foram apontadas como as causas de uma variedade de outros tipos de distrofias musculares.

93. Em relação à intoxicação por etanol, selecione a única opção FALSA:
A. O aumento da produção de NADH por meio da reação da álcool desidrogenase (ADH) favorece a formação de lactato a partir de piruvato.
B. A diminuição resultante do nível de piruvato necessário para a reação da piruvato-carboxilase inibe a gliconeogênese e pode promover a hipoglicemia.
C. O acetaldeído, produzido pela reação de ADH, é uma molécula altamente reativa e pode ser responsável por alguns dos efeitos tóxicos do etanol.
D. O etanol pode se intercalar nas membranas e também interagir com os canais iônicos, afetando suas funções.
E. O etanol é metabolizado exclusivamente pela álcool desidrogenase.

94. Em relação à gota, selecione a única opção FALSA:
A. A gota é provocada pelo acúmulo de ácido úrico em uma ou mais articulações e em outros tecidos, provocando inflamação aguda ou crônica.
B. O ácido úrico é o produto final do metabolismo de purinas e pirimidinas.
C. O ácido úrico é produzido a partir da xantina pela ação da xantina oxidase; seres humanos não possuem a enzima uricase e, assim, não podem produzir alantoína.
D. A diminuição da excreção de ácido úrico é a principal causa da gota.
E. Ataques agudos de gota são tratados usando medicamentos anti-inflamatórios ou colchicina; alopurinol, que inibe a xantina oxidase, é um fármaco eficiente para o tratamento de longo prazo da gota.

95. Em relação à hemocromatose hereditária, selecione a única opção FALSA:
A. O diagnóstico diferencial da hemocromatose hereditária é um aumento do ferro total no corpo, suficiente para causar dano tecidual.
B. O ferro livre é tóxico porque ele pode gerar radicais livres por meio da reação de Fenton.
C. Níveis elevados de saturação de transferrina e de ferritina sérica são os testes mais úteis para o diagnóstico precoce.
D. A causa mais comum dessa condição são mutações no gene que codifica a proteína HFE; o papel principal do HFE é a regulação do nível de hepcidina.
E. A terapia de quelação para remover o excesso de ferro é o tratamento preferido para essa condição.

96. Em relação ao hipotireoidismo, selecione a única opção FALSA:
A. Causas do hipotireoidismo primário incluem o consumo deficiente de iodo e a doença de Hashimoto (uma condição autoimune).
B. Os sintomas incluem fadiga crônica, lentidão, constipação e intolerância ao frio.
C. O hipotireoidismo congênito pode e deve ser detectado pela triagem de rotina dos níveis de TSH logo após o nascimento.
D. Níveis elevados de TSH e de T_4 são altamente indicativos de hipotireoidismo.
E. O tratamento do hipotireoidismo primário consiste na administração criteriosa de tireoxina (T_4), geralmente por toda a vida.

97. Em relação à desnutrição de proteína-energia (PEM), selecione a única opção FALSA:
A. O estresse oxidativo, afetando a permeabilidade vascular, pode contribuir para o quadro clínico do *kwashiorkor*.
B. Os sintomas do *kwashiorkor* incluem cabelo fino, apatia, esteatose hepática, abdome protuberante, pele frágil e redução da gordura corporal.
C. O edema é geralmente uma característica do *kwashiorkor*; fatores que contribuem para o seu desenvolvimento podem

ser a hipoalbuminemia e o consumo dietético deficiente de metionina.
D. Níveis baixos de insulina e cortisol contribuem para a perda muscular encontrada no marasmo.
E. A PEM é inteiramente evitável por meio de uma dieta balanceada.

98. Em relação ao infarto do miocárdio (IM), selecione a única opção FALSA:
A. A principal causa de um IM é um trombo oclusivo ocorrendo muito próximo de uma placa aterosclerótica que pode ter se rompido recentemente.
B. Medidas em série de CK-MB são o principal teste laboratorial para confirmar o diagnóstico de IM.
C. A presença de LDL oxidada em uma placa estimula o recrutamento de células inflamatórias, que são importantes contribuintes para a aterosclerose.
D. Fatores que contribuem para a morte celular em um IM incluem a depleção de ATP, a ativação de várias enzimas degradativas e o acúmulo intracelular de Ca^{2+}.
E. Um tratamento para o IM é a administração de t-PA; esta enzima pode ajudar a dissolver o trombo e impedir dano cardíaco adicional quando administrado o mais rápido possível.

99. Em relação à obesidade, selecione a única opção FALSA:
A. Um índice de massa corporal (IMC) superior a 30 é indicativo de obesidade.
B. A obesidade predispõe a várias condições, inclusive síndrome metabólica; ela inclui excesso de gordura abdominal, alto nível de glicose no sangue; LDL alta e HDL baixa e pressão arterial alta.
C. O neuropeptídeo Y e o hormônio estimulador de melanócitos (α-MSH) aumentam o apetite.
D. Os níveis elevados de leptina, um polipeptídeo liberado por adipócitos, diminui o consumo de alimentos e também aumenta o gasto energético.
E. O tecido adiposo marrom contém uma proteína mitocondrial, a termogenina, que dissipa a energia como calor; diferenças nas quantidades dessa proteína e talvez de outras proteínas de desacoplamento podem desempenhar um papel fundamental na etiologia da obesidade.

100. Em relação à osteoporose, selecione a única opção FALSA:
A. A osteoporose é uma redução de massa ou densidade óssea.
B. Na osteoporose, uma razão normal entre o osso mineral (hidroxiapatita) e a matriz óssea (principalmente colágeno tipo I) é preservada.
C. Na osteomalácia, como a causada pela deficiência de vitamina C, ocorre uma redução da mineralização.
D. Uma redução nos níveis de estrogênio parece aumentar a secreção de várias citocinas que levam ao recrutamento de osteoclastos, estimulando o aumento da reabsorção.
E. Os níveis de Ca, P, fosfatase alcalina, 25-hidroxivitamina D e paratormônio podem todos ser normais na osteoporose.

101. Em relação à xeroderma pigmentosa (XP), selecione a única opção FALSA:
A. Essa condição se deve a mutações em qualquer um de pelo menos sete genes envolvidos na via de reparo de malpareamento de DNA.
B. A radiação UV pode causar a formação de dímeros de timina, nos quais as ligações covalentes são formadas entre dímeros de resíduos de timina intracadeia.
C. A formação dos dímeros de timina pode ser medida em fibroblastos retirados de um paciente.
D. Pacientes com XP desenvolvem cânceres em uma idade precoce devido a defeito no reparo de DNA; a radiação UV pode ativar oncogenes ou inativar genes supressores de tumores.
E. Pacientes com XP devem ser acompanhados atentamente e aconselhados a evitar a exposição à luz solar e usar protetores solares adequados.

Apêndice

Páginas selecionadas da *internet*

A seguir, uma lista de páginas da *internet* que os leitores podem considerar úteis. As páginas foram visitadas várias vezes por um ou mais dos autores. A maioria está localizada nos Estados Unidos, mas várias fornecem extensos *links* para páginas internacionais e para bancos de dados (p. ex., para sequências de ácidos nucleicos e proteínas) e para periódicos *online*. Robert K. Murray ficaria agradecido se os leitores que encontrassem outras páginas úteis o informassem sobre seus endereços eletrônicos por *e-mail* (rmurray6745@rogers.com) para que sua inclusão possa ser levada em conta nas edições futuras desta publicação. Os leitores devem levar em conta que os endereços eletrônicos podem mudar ou deixar de existir.

Acesso à literatura biomédica

High Wire Press: http://highwire.stanford.edu/
(Listas extensas de vários tipos de jornais – biologia, medicina, etc.— oferece também a mais extensa lista de jornais com acesso grátis *online*.)

National Library of Medicine (Livraria Nacional de Medicina): http://www.nlm.nih.gov/
(Acesso grátis ao Medline via PubMed).

Páginas gerais de pesquisa

Access Medicine from McGraw-Hill: http://accessmedicine.com/features.aspx
Uma página por assinatura contendo textos médicos e de ciência básica *online,* além de muitos outros recursos.

The Biology Project (O Projeto Biologia da Universidade do Arizona): http://www.biology.arizona.edu/default.html
(Contém excelente abordagem bioquímica de enzimas, membranas, etc.)

Harvard University Department of Molecular & Cellular Biology Links (Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade de Harvard): http://mcb.harvard.edu/BioLinks.html
(Contém vários *links* úteis.)

Lister Hill National Center for Biomedical Communications (Centro Lister Hill Nacional de Comunicações Biomédicas): http://www.lhncbc.nlm.nih.gov/
(Inclui Perfis em Ciência, Guia de Referências em Genética, informação sobre ensaios clínicos e um guia abrangente para os códigos de rastreamento mais recentes.)

Medical Encyclopedia in MedlinePlus (Enciclopédia Médica no Medline Plus): http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/encyclopedia.html
(Inclui milhares de artigos sobre doenças. Também há testes, fotografias médicas e ilustrações.)

MITOPENCOURSEWARE: http://ocw.mit.edu/courses/biology
(Vários cursos de Biologia ministrados no MIT são acessíveis por essa página.)

A Página Oficial do Prêmio Nobel: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/
(A página contém as conferências dos vencedores do Prêmio Nobel e, portanto, fornece uma fonte rica de informação biomédica.)

Páginas sobre tópicos específicos

American Heart Association (Associação Americana do Coração): http://www.heart.org/
(Informações importantes sobre nutrição, sobre o papel de várias biomoléculas – p. ex., colesterol, lipoproteínas – nas doenças cardíacas e nas principais doenças cardiovasculares.)

Cancer Genome Anatomy Project (Projeto de Anatomia do Genoma do Câncer, CGAP): http://www.cgap.nci.nih.gov/
(Um programa interdisciplinar que auxiliou a gerar informações e ferramentas técnicas a fim de decifrar a anatomia molecular da célula cancerosa.)

Carbohydrate Chemistry and Glycobiology: A Web Tour: (Química de Carboidratos e Glicobiologia: Um *Tour* pela *Web* http://sciencemag.org/site/feature/data/carbohydrates.xhtml
(Contém *links* para química orgânica, química de carboidratos e glicobiologia.)

European Bioinformatics Institute (Instituto Europeu de Bioinformática): http://www.ebi.ac.uk/
(Contém bancos de dados sobre genomas, sequências de nucleotídeos, sequências de proteínas, etc.)

GeneCards: http://www.genecards.org/
(Um banco de dados de genes humanos, seus produtos e seus envolvimentos com doenças; do Weizmann Institute of Science [Instituto Weizmann de Ciência].)

GeneTests: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GeneTests
(Uma fonte de informação sobre genética médica para médicos e artigos abrangentes [em GeneReviews] sobre várias doenças genéticas)..

Genetics Home Reference (Guia de Referência em Genética): http://ghr.nlm.nih.gov/

(Um guia para a compreensão das condições genéticas, principalmente para o público leigo, contendo informação sobre mais de 550 condições de saúde e mais de 800 genes.)

Howard Hughes Medical Institute (Instituto Médico Howard Hughes): http://www.hhmi.org/

(Uma excelente página para acompanhar as pesquisas biomédicas atuais. Contém um abrangente Arquivo de Pesquisa de Notícias.)

Human Gene Mutation Database (Banco de Dados de Mutações do Genoma Humano): http://www.hgmd/org

(Uma tabulação extensa de mutações em genes humanos do Institute of Medical Genetics – Instituto de Genética Médica, em Cardiff, País de Gales.)

Human Genome Project Information (Informação sobre o Projeto Genoma Humano): http://www.genomics.energy.gov

(Do Departamento Norte-Americano de Energia; também contém informação geral sobre genômica e sobre genomas microbianos.)

J. Craig Venter Institute: http://www.jcvi.org

(Contém informação sobre biologia sintética, sequências de genomas bacterianos e outras informações.)

Karolinska Institute: Diseases, Disorders and Related Topics (Instituto Karolinska: Doenças, Distúrbios e Tópicos Relacionados): http://www.mic.stacken.kth.se/Diseases/

(Uma página abrangente contendo *links* para informação sobre a maioria dos tipos de doenças.)

Lipids Online (Lipídeos *Online*): http://lipidsonline.org/

(Um recurso do Baylor College of Medicine contendo materiais educativos sobre aterosclerose.)

MITOMAP: http://www.mitomap.org/

(Um banco de dados do genoma mitocondrial humano.)

National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer): http://www.cancer.gov/

(Contém informações sobre vários tipos de câncer e também sobre a pesquisa atual sobre o câncer.)

National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para a Informação Biotecnológica: http://ncbi.nlm.nih.gov/

(Fornece acesso a informações biomédicas e genômicas.)

National Human Genome Research Institute (Instituto Nacional de Pesquisa sobre o Genoma Humano): http://www.genome.gov/

(Extensa informação sobre o Projeto Genoma Humano e trabalhos subsequentes.)

National Institute of Health (Instituto Nacional de Saúde): http://www.nih.gov/

(Inclui *links* para os Institutos e Centros separados que constituem o NIH, abrangendo um amplo espectro da pesquisa biomédica.)

Office of Rare Diseases (Departamento de Doenças Raras): http://rarediseases.info.nih.gov

(Acesso a informações sobre a maioria das doenças raras, inclusive pesquisas atuais e um Programa sobre Doenças Não Diagnosticadas.)

OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man, Herança Mendeliana Humana *Online*): http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim

(Uma fonte extremamente abrangente sobre doenças genéticas humanas iniciada pelo Dr. Victor A. McKusick, considerado por muitos como o pai da genética humana moderna.)

RCSB Protein Data Bank (Banco de Dados de Proteína): http://www.pdb.org

(Um repositório para processamento e distribuição dos dados da estrutura tridimensional de macromoléculas biológicas.)

Society for Endocrinology (Sociedade para Endocrinologia): http://www.endocrinology.org/

(A página tem como objetivo promover a educação e a pesquisa em endocrinologia para o benefício público.)

Society for Neuroscience (Sociedade para a Neurociência): http://www.sfn.org

(Contém informação útil sobre vários tópicos em neurociência.)

The Broad Institute: http://www.broad.mit.edu/

(O Instituto Broad é uma colaboração de pesquisa do MIT, Harvard e seus hospitais afiliados – criados para trazer o poder da genômica para a medicina.)

The Endocrine Society (A Sociedade Endócrina): http://www.endo-society.org/

(A Sociedade é dedicada à pesquisa sobre hormônios e sobre a prática clínica da endocrinologia.)

The Protein Kinase Resource (A Fonte sobre a Proteína Quinase): http://pkr.genomics.purdue.edu/

(Informação sobre a família de enzimas da proteína quinase.)

The UCSD-Nature Signaling Gateway (UCSD-Portal de Sinalização da Natureza): http://www.signalinggateway.org/

(Uma fonte abrangente para qualquer pessoa interessada em transdução de sinais.)

The Wellcome Trust Sanger Institute: http://www.sanger.ac.uk/

(Um centro de pesquisa sobre o genoma cuja proposta é a de aumentar o conhecimento sobre genomas, particularmente pelo sequenciamento e pela análise em grande escala).

Periódicos sobre bioquímica e revisões

A seguir, uma lista parcial dos periódicos sobre bioquímica, séries de revisão e alguns periódicos biomédicos que contêm artigos sobre bioquímica. Agora, a maioria dos periódicos de biologia e bioquímica têm páginas na *internet*, frequentemente com *links* úteis, sendo alguns periódicos totalmente acessíveis sem qualquer custo. O leitor pode obter os endereços eletrônicos dos periódicos listados utilizando a ferramenta de busca.

- *Annual Reviews of Biochemistry, Cell and Developmental Biology, Genetics, Genomics and Human Genetics*
- *Archives of Biochemistry and Biophysics (Arch. Biochem. Biophys.)*
- *Biochemical and Biophysical Research Communications (Biochem, Biophys. Res. Commun.)*
- *Biochemical Journal (Biochem J.)*
- *Biochemistry (Biochemistry)*
- *Biochemistry (Moscow) (Biochemistry [Mosc])*

- *Biochemistry and Cell Biology (Biochem. Cell Biol.)*
- *Biochimica et Biophysica Acta (Biochim. Biophys. Acta)*
- *Biochimie (Biochimie)*
- *European Journal of Biochemistry (Eur. J. Biochem.)*
- *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics (Indian J. Biochem. Biophys.)*
- *Journal of Biochemistry (Tokyo) (J. Biochem. [Tokyo])*
- *Journal of Biological Chemistry (J. Biol. Chem.)*
- *Journal of Clinical Investigation (J. Clin. Invest.)*
- *Journal of Lipid Research (J. Lipid Res.)*
- *Nature (Nature)*
- *Nature Genetics (Nat. Genet.)*
- *Proceedings of the National Academy of Sciences USA (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)*
- *Public Library of Science (PLoS) Journals; PLOS One and the journals on Biology, Genetics, Medicine, and other subjects are available free online (e.g. http://www.plosone.org)*
- *Science (Science)*
- *Trends in Biochemical Sciences (Trends Biochem. Sci.)*

Banco de Respostas

Seção I

1. **D**.	2. **A**.	3. **D**.	4. **C**.
5. **A**.	6. **E**.	7. **B**.	8. **C**.
9. **A**.	10. **D**.	11. **E**.	12. **C**.
13. **B**.	14. **E**.	15. **D**.	16. **D**.
17. **E**.	18. **B**.	19. **B**.	20. **C**.
21. **D**.	22. **B**.	23. **B**.	24. **C**.

Seção II

1. **E**. 2. **A**. 3. **E**.

4. **D.** Tiamina pirofosfato é uma coenzima da piruvato--desidrogenase.

5. **E.** A xilulose, que é excretada em pentosúria essencial, é um composto redutor e irá, portanto, fornecer um resultado positivo com o reagente de cobre alcalino.

6. **D.** Após 24 horas, suas reservas de glicogênio do fígado e do músculo estarão quase completamente esgotadas e sua glicose plasmática terá caído para cerca de 3 a 4 mmol/L. Não há glicogênio na corrente sanguínea. Em resposta à baixa insulina e ao alto glucagon, ele liberará ácidos graxos livres do tecido adiposo como fonte de combustível metabólico para os tecidos que podem metabolizar ácidos graxos, poupando, assim, glicose para o cérebro e células sanguíneas vermelhas.

7. **C.** À medida que ele se torna progressivamente mais faminto, seu fígado irá sintetizar corpos cetônicos como um combustível adicional para o músculo, que não pode satisfazer todas as necessidades energéticas a partir do metabolismo dos ácidos graxos. Isso poupa glicose para o cérebero e para as hemácias.

8. **D**. 9. **C**. 10. **C**. 11. **E**.
12. **D**. 13. **D**.

14. **A.** Quilomícrons são sintetizados na mucosa intestinal, contendo principalmente triacilglicerol de lipídeos da dieta; e tecidos periféricos consomem ácidos graxos por meio da ação da lipase lipoproteica extracelular. Vestígios de quilomícrons são eliminados pelo fígado.

15. **E**. VLDL é secretado pelo fígado contendo tanto triacilglicerol recentemente sintetizado quanto triacilglicerol dos remanescentes de quilomícrons; e tecidos periféricos obtêm ácidos graxos por meio da ação da lipase lipoproteica extracelular.

16. **D**. Lipoproteína de densidade intermediária resulta da remoção de triacilglicerol de lipoproteínas de muito baixa densidade pelos tecidos periféricos. Ela então obtém colesterol e proteínas de lipoproteínas de alta densidade para se tornarem lipoproteínas de baixa densidade, que normalmente são eliminadas pelo fígado.

17. **A.** Os quilomícrons são sintetizados na mucosa intestinal, contendo principalmente triacilglicerol de lipídeos da dieta; e tecidos periféricos obtêm ácidos graxos por meio da ação da lipase lipoproteica extracelular. Os remanescentes de quilomícrons são eliminados pelo fígado. Corpos cetônicos e ácidos graxos não esterificados são elevados no jejum, não após uma refeição.

18. **E.** Os quilomícrons são principalmente eliminados por tecidos periféricos dentro de cerca de duas horas após uma refeição, e os remanescentes de quilomícrons são eliminados pelo fígado. O triacilglicerol residual mais o triacilglicerol recém sintetizado no fígado são secretados em lipoproteína de muito baixa densidade como uma fonte de combustível para os tecidos periféricos. Corpos cetônicos e ácidos graxos não esterificados são elevados durante o jejum, não após uma refeição.

19. **D**.

20. **C**.

21. **C**. As estatinas inibem a atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase, a enzima que converte 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA a mevalonato na via da biossíntese do colesterol.

22. **A**.	23. **B**.	24. **E**.	25. **D**.
26. **C**.	27. **B**.	29. **D**.	29. **C**.

Seção III

1. **B.** A inserção de selenocisteína em um peptídeo ocorre *durante* a tradução e é dirigida por um tRNA específico, $tRNA^{Sec}$.

2. **D.** A fenilalanina hidroxilase não converte tirosina em fenilalanina.

3. **E.** Histamina.

4. **B.** Transaminação piridoxal dependente é a primeira reação na degradação de todos os aminoácidos comuns, exceto treonina, lisina, prolina e hidroxiprolina.

5. **A.** Alanina.

6. **A.** O esqueleto de carbono da alanina contribui ao máximo para a gliconeogênese hepática.

7. **B.** O ATP e a ubiquitina participam da degradação de proteínas não associadas à membrana e proteínas com meias-vidas *curtas*.

8. **C.** Sinais clínicos de distúrbios metabólicos do ciclo da ureia incluem a *alcalose* respiratória, não a acidose.

9. **E.** Fumarase *citosólica* e malato desidrogenase *citosólica* convertem fumarase a oxalacetato a partir de uma reação *citosólica* do ciclo da ureia.

10. **B.** A *serina* fornece o radical tioetanol para a coenzima A.

11. **C.** A descarboxilação do *glutamato* forma GABA.

12. **E** não é uma hemoproteína. Em casos de anemia hemolítica, a albumina pode se ligar a alguma metheme, mas ao contrário de outras proteínas listadas, a albumina não é uma hemoproteína.

13. **B.** Porfiria aguda intermitente se deve a mutações no gene da uroporfirina-I-sintase.
14. **A.** A bilirrubina é um tetrapirrol *linear*.
15. **D.** A icterícia severa, dor abdominal superior e perda de peso, além dos resultados laboratoriais indicando um tipo obstrutivo de icterícia, são consistentes com o câncer do pâncreas.

Seção IV

1. **D**. β,γ-Metileno e β,γ-imino trifosfatos de purina e pirimidina não liberam prontamente o fosfato terminal por hidrólise ou por transferência do grupo fosforila.
2. **D**.
3. **E.** A pseudouridina é excretada inalterada na urina humana, e não há indicação de patologia nessa condição.
4. **A.** Distúrbios metabólicos são associados, raramente, a defeitos do catabolismo de pirimidinas, que forma os produtos solúveis em água.

5. **B**.	6. **D**.	7. **B**.	8. **C**.
9. **C**.	10. **D**.	11. **E**.	12. **B**.
13. **D**.	14. **D**.	15. **5**.	16. **A**.
17. **C**.	18. **B**.	19. **D**.	20. **B**.
21. **C**.	22. **A**.	23. **C**.	24. **A**.
25. **E**.	26. **B**.	27. **A**.	28. **E**.
29. **C**.	30. **A**.	31. **A**.	32. **C**.
33. **D**.	34. **E**.	35. **C**.	36. **B**.
37. **C**.	38. **E**.	39. **D**.	40. **D**.
41. **B**.	42. **A**.	43. **A**.	44. **E**.
45. **C**.	46. **A**.	47. **C**.	48. **D**.
49. **C**.	50. **B**.	51. **E**.	52. **C**.
53. **D**.	54. **A**.	55. **E**.	56. **A**.
57. **E**.	58. **C**.	59. **A**.	60. **D**.
61. **D**.	62. **E**.	63. **A**.	64. **C**.
65. **C**.	66. **E**.	67. **D**.	

Seção V

1. **B.** Os glicolipídeos estão localizados na membrana externa.
2. **A.** Hélices α são importantes constituintes das proteínas de membrana.
3. **E.** A insulina também aumenta o consumo de glicose no músculo.
4. **A.** Sua ação mantém a alta concentração intracelular de potássio em comparação com o sódio.

5. **D**.	6. **B**.	7. **C**.	8. **B**.
9. **D**.	10. **A**.	11. **E**.	12. **B**.
13. **D**.	14. **E**.	15. **B**.	16. **C**.
17. **A**.	18. **C**.	19. **A**.	20. **B**.
21. **D**.	22. **A**.		

Seção VI

1. **C**.	2. **D**.	3. **E**.	4. **E**
5. **C**.	6. **B**.	7. **C**.	8. **B**.
9. **E**.	10. **A**.	11. **A**.	12. **C**.
13. **E**.	14. **B**.	15. **B**.	16. **D**.
17. **A**.			

18. **A.** A superóxido desmutase serve para remover o radical superóxido.
19. **A.** A ativação dos macrófagos leva à produção de radicais de oxigênio.
20. **B**.
21. **A**. A glicosilação pode ocorrer em outros sítios, por exemplo, no RE.
22. **E.** Importinas estão envolvidas na importação de proteínas para o núcleo.
23. **B.** Algumas proteínas de mamíferos são translocadas pós--tradução.
24. **C.** A ubiquitina está envolvida na degradação de proteínas por proteassomos.
25. **E.** A furina converte pró-albumina em albumina.
26. **C**.
27. **A**.
28. **C**. Alguns dos açúcares originais fornecidos pelo composto dolicol são subsequentemente removidos e substituídos por outros açúcares.
29. **C**. A glicação da hemoglobina ocorre em indivíduos normais, mas geralmente em um nível significativamente mais baixo.
30. **B.** A doença da célula I é devida a mutações em um gene codificando uma GlcNAc fosfotransferase.
31. **D.** O colágeno contém ligações cruzadas.
32. **C**. Deleções no gene da elastina são responsáveis por vários casos da síndrome de Williams-Beuren.
33. **B**. Alguns casos da síndrome de Ehler-Danlos não se devem a mutações que afetam os genes que codificam os vários tipos de colágeno.
34. **B.** O ácido hialurônico não é sulfatado.
35. **C.** A síndrome de Hurler se deve a uma deficiência da α-L--iduronidase.
36. **D.** A acrondoplasia se deve a mutações no gene FGFR3.
37. **D.** A tropomiosina é um constituinte do filamento fino.
38. **D.** A miosina-ATP tem uma baixa afinidade pela actina, promovendo a liberação de actina a partir da actina-miosina.
39. **B.** Não há qualquer evidência de que a Na^+-K^+-ATPase esteja envolvida no MH.
40. **B.** O músculo cardíaco contém o sistema troponina e o músculo liso não.
41. **C.** NO ativa a guanilil-ciclase, não a adenilil-ciclase.
42. **E.** A creatina fosfato é uma fonte importante de energia durante os primeiros poucos segundos.
43. **A.** Os microfilamentos não contêm miosina.
44. **E.** NFkB é um fator de transcrição, não uma proteína plasmática.
45. **C.** Indivíduos com analbuminemia apresentam apenas edema moderado; um aumento na concentração no plasma de outras proteínas parece compensar a deficiência de albumina.

46. **D.** A transferrina não é degradada dentro dos endossomos, sendo, em vez disso, reutilizada.

47. **A.** Quando os níveis intracelulares de ferro são altos, a síntese de ferritina aumenta e aquela de TfR1 diminui.

48. **D.** Níveis elevados de protoporfirina das hemácias são, em geral, encontrados na anemia por deficiência de ferro. Observe que os testes D e E não são uma parte rotineira dos exames de um paciente com anemia por deficiência de ferro.

49. **B.** Uma ATPase diferente que se liga ao cobre está envolvida na causa da doença de Menkes.

50. **A.** Não há relação entre a amilase e a amiloidose.

51. **A.** Todas as imunoglobulinas são glicoproteínas.

52. **C.** As proteínas Bence-Jones são cadeias leves.

53. **D**.

54. **D.** Das proteínas listadas, apenas o fator II é um fator de coagulação dependente da vitamina K.

55. **D**.

56. **E.** A GPIIb-IIIa (integrina αIIbβ3) não é um receptor acoplado à proteína G.

57. **A.** A hemofilia A, sendo uma doença ligada ao cromossomo X, é muito pouco provável de ocorrer em uma mulher.

58. **E.** Mutações no gene da piruvato-quinase provocam uma anemia hemolítica, mas não PNH.

59. **D.** As hemácias não possuem mitocôndrias e, portanto, não possuem o ciclo do ácido cítrico.

60. **B**. Em uma anemia hemolítica, os níveis da bilirrubina não conjugada são frequentemente elevados e os níveis de Hp diminuem devido à liberação de hemoglobina no plasma.

61. **A.** A piruvato-quinase está presente no citosol.

62. **B.** Indivíduos do grupo sanguíneo AB não apresentam nem anticorpos antiA nem anticorpos antiB.

63. **C.** A lisozima hidrolisa a ligação entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetil-D-glicosamina.

64. **B.** A enzima contém o citocromo b_{558}, não o citocromo P450.

65. **D.** O superóxido não é o produto da reação catalisada pelo citocromo P450.

66. **A.** Hidroxilação é uma reação da fase 1.

67. **A.** O GSH é um tripeptídeo contendo ácido glutâmico, cisteína e glicina.

68. **D**. 69. **B**. 70. **E**. 71. **B**.

72. **B.** A maioria das substâncias químicas carcinogênicas interage covalentemente com o DNA.

73. **B.** Certos vírus de DNA também são carcinogênicos.

74. **E.** Mutações em aproximadamente cinco a seis desses genes são necessárias para a carcinogênese.

75. **E**. O PDGF estimula a fosfolipase C, não a fosfolipase A.

76. **D.** A ligação de RB a E3F bloqueia a progressão da célula da fase G1 à fase S.

77. **C.** A instabilidade do microsatélite é causada por anormalidades do reparo de malpareamento.

78. **E.** O dicloroacetato inibe a piruvato-desidrogenase quinase.

79. **D.** A angiogenina é um inibidor da angiogênese.

80. **B.** O citocromo c é liberado da mitocôndria.

81. **E.** Apenas cerca de 1:10.000 células cancerosas podem ter a capacidade de colonizar.

82. **C.** A depuração de creatinina é uma estimativa da taxa de filtração glomerular (GFR). Portanto, a medida da depuração de creatinina pode ajudar a detectar a falência renal nos seus estágios iniciais. As medidas da ureia e creatinina no sangue não são marcadores sensíveis da função renal. A proteinúria é um sinal importante da doença renal, mas a proteína urinária pode também ser elevada em outras condições patológicas e em condições fisiológicas tais como gravidez, postura ereta prolongada, exposição ao frio intenso, exercício vigoroso, etc. Os níveis de amônia na urina dependem de vários fatores como, por exemplo, a condição acidobásica do corpo e a função hepática. O volume da urina depende da quantidade de água consumida e da perda de água devida ao suor, etc.

83. **A.** O fígado sintetiza a maior parte das proteínas plasmáticas, inclusive a albumina. Um nível baixo de albumina sérica é caracteristicamente encontrado na falência hepática crônica. A hipoalbuminemia também pode ser causada pela perda de albumina na urina (p. ex., síndrome nefrótica) ou desnutrição (p. ex., *kwashiorkor*). A medida da bilirrubina total e conjugada fornece informação sobre a capacidade do fígado em conjugar e excretar bilirrubina. A alanina transaminase (ALT) é um marcador da lesão no hepatócito, e a fosfatase alcalina (ALP) é um marcador da obstrução biliar. Os níveis de amônia no sangue indicam a capacidade do fígado em metabolizar a amônia.

84. **C.** Uma substância ideal, cuja depuração é representativa do GFR, deve apresentar concentrações estáveis no sangue, ser filtrada livremente no glomérulo e não deve ser nem reabsorvida nem secretada pelo túbulo renal. Uma substância que é metabolizada pelo corpo não terá níveis sanguíneos estáveis e, portanto, não é adequada para medir o GFR.

85. **B.** Os níveis de TSH são em geral fortemente aumentados no hipotireoidismo primário e suprimidos ou indetectáveis no hipertireoidismo primário. Como a maior parte dos casos de hipo e hipertireoidismo se deve a distúrbios principalmente relacionados à glândula tireoide, a medida do TSH demonstrou ser uma estratégia econômica e eficiente clinicamente no diagnóstico dos distúrbios da tireoide. Além disso, ensaios altamente sensíveis para o TSH estão agora disponíveis comercialmente. Os níveis totais de tireoxina podem ser afetados por mudanças nos níveis de globulina ligada à tireoide, mesmo no estado eutireoideo. As medições de tireoxina livre e tri-iodotironina são tecnicamente difíceis e caras e, portanto, não são preferidas como o primeiro teste na avaliação da função tireoidiana.

86. **A.** A deficiência da ADA é responsável por apenas 15% dos casos de SCID.
87. **D.** *APOE4* parece diminuir a depuração de $A\beta_{42}$.
88. **C.** A subunidade A faz a reação de ADP-ribosilação na subunidade Gs.
89. **E.** O CEA não é um teste excelente para a detecção do câncer colorretal porque sua sensibilidade e especificidade são relativamente baixas.
90. **B.** O gene CF foi descoberto pelo uso da "genética reversa", não devido a uma deleção massiva no cromossomo 7.
91. **B.** A acetona é também um corpo cetônico.
92. **A.** A CK-MM é a isozima de creatina-quinase que deve ser medida se o DMD é suspeito. Frequentemente, é usada a medida da atividade total de CK.
93. **E.** O etanol também é metabolizado por um citocromo P450 microssomal.
94. **B.** O ácido úrico não é produzido a partir do metabolismo de pirimidinas.
95. **E.** O tratamento preferido é a flebotomia.
96. **D.** Os níveis de T_4 diminuem no hipotireoidismo primário.
97. **D.** Níveis elevados de cortisol favorecem a perda muscular.
98. **B**. O emprego das medições de troponina T substituiu o uso de CK-MB, parcialmente porque ele é um marcador bioquímico mais sensível do dano ao músculo cardíaco.
99. **C.** O α-MSH diminui o apetite.
100. **C.** A osteomalácia se deve à deficiência de vitamina D, não à de vitamina C.
101. **A.** A XP envolve mutações na via de reparo por excisão de nucleotídeos do DNA.

Índice

Observação: Os números de páginas seguidos por um *f* indicam figuras; e os números de páginas seguidos por *t* indicam tabelas.

A

AAV. *Ver* Adenovírus, vírus associado
$A\beta_{42}$. *Ver* Peptídeo β-amiloide
ABC-1. *Ver* Transportadores cassete de ligação ao ATP 1
Abetalipoproteinemia 240, 258-259*t*
ABG. *Ver* Sangue arterial, análise de gases
Abordagem de animal transgênico, 426-427
Abordagem de engenharia reversa, 102-103
Abordagem do gene quimérico, 426-427
Absorção, 518
Ação hormonal dependente de cálcio e metabolismo do fosfatidilinositol, 506, 507
ACAT. *Ver* Acil-CoA: colesterol aciltransferase
Acelerador da conversão da protrombina sérica, 651, 651*f*, 652*t*, 653*t*
  fármacos cumarínicos que afetam, 655
Aceptor de prótons, bases como, 11
Aceruloplasminemia, 641
ACEs. *Ver* Angiotensina, inibidores da enzima conversora de
Acetaldeído, 741, 742*f*
Acetaldeído desidrogenase, 742
Acetilação, 680-681
  de histonas, 710
  na modificação covalente, 31*t*
N-acetilactosamina, unidades de, 575
Acetil-CoA carboxilase, 217
  na regulação da lipogênese, 218*f*, 219-221, 221*f*
Acetilcolina, inibição da liberação de, 565-566
N-acetilgalactosamina ligada à serina, 573*f*
N-acetilglutamato, na biossíntese da ureia, 277-278*f*
Acetiltransacilase, 217*f*, 218*f*, 219
Acetoacetato, 210, 211-212*f*
  no catabolismo da tirosina, 289*f*
Acetoacetil-CoA sintetase na síntese de mevalonato, 251, 251*f*
Acetona, 210
Acidemia, isovalérica, 284*t*, 293
Acidemia isovalérica, 293
Ácido acético, 142*t*
  valor de pK/pKa, 14*t*
Ácido α-linoleico, para deficiência de ácidos graxos essenciais, 223-224
Ácido anídrico, ligações, 325
Ácido aracdônico/aracdonato, 142, 143*f*, 222, 222*f*
  formação eicosanoide e, 224-225, 224-227*f*
  para-deficiência de ácidos graxos essenciais, 223-224
Ácido ascórbico (vitamina C), 197, 540
  como antioxidante, 148
  deficiência de, 540
    colágeno afetado na, 46, 540
  na síntese do colágeno, 46, 540
Ácido aspártico, 19*t*
  pI de, 20-21
Ácido β-hidroxibutírico, 331, 340-341*f*
Ácido butírico, 142*t*
Ácido caproico, 142*t*
Ácido carbônico, valor de pK/pKa, 13
Ácido cervônico, 142*t*
Ácido cítrico, valor de pK/pKa, 14*t*
Ácido cólico, 256-257
Ácido conjugado, 12
Ácido desoxicólico, síntese do, 256-257
Ácido desoxirribonucleico. *Ver* DNA
Ácido docosahexaenoico, 223-224
Ácido eicosapentaenoico, 222*f*, 226-227
Ácido elaídico, 142*t*, 143, 143*f*
Ácido esteárico, 142*t*
Ácido fitânico, doença de Refsum causada pelo acúmulo de, 215
Ácido fítico (inositol hexafosfato), absorção do cálcio afetada por, 521
Ácido fólico, 527, 538-539
  coenzimas derivadas do, 59
  deficiência de, 283
  formas na dieta, 538-539
  inibidores do metabolismo do, 538-539
  suplementar, 538-539
Ácido fórmico, valor de pK/pKa do, 14*t*
Ácido fosfatídico, 144, 144*f*, 461, 461*f*
Ácido fosfórico, valor de pK/pKa, 14*t*
Ácido glicocólico, síntese do, 256-257*f*
Ácido glicoquenodesoxicólico, síntese do, 256-257*f*
Ácido glutâmico, 19*t*
Ácido glutárico, valor de pK/pKa, 14*t*
Ácido graxo oxidase, 208-209
Ácido graxo sintase, 77, 217-219
Ácido hialurônico, 136-137, 138*f*, 598
Ácido hipúrico/hipurato, síntese do, 299, 299*f*
Ácido holo-*trans*-retinoico, 715-716*t*
Ácido lático, valor de pK/pka, 14*t*
Ácido láurico, 142*t*
Ácido linoleico/linoleato, 142*t*, 222, 222*f*, 223-224
  na deficiência de ácidos graxos essenciais, 223-224
  síntese do, 223-224*f*
Ácido litocólico, síntese do, 256-257*f*
Ácido mirístico, 142*t*
Ácido *N*-acetilneuramínico, 204-205*f*, 139*f*, 139*t*
  em gangliosídeos, 234-235, 234-235*f*
  em glicoproteínas, 203, 204-205*f*, 570-571*t*
Ácido N-acetilneuramínico, 574-575
Ácido neuramínico, 139, 146
Ácido nicotínico, 535. *Ver também* Niacina
  como fármaco hipolipidêmico, 258-259
Ácido oleico, 141, 141*f*, 142*t*, 143*f*
Ácido palmítico, 142*t*
Ácido palmitoleico, 142*t*, 222*f*
  síntese do, 222
Ácido pantotênico, 217, 540
  coenzimas derivadas do, 59
  no ciclo do ácido cítrico, 166
Ácido pteroilglutâmico. *Ver* Ácido fólico
Ácido quenodesoxicólico, 256-257, 256-257*f*, 257-258
Ácido retinoico, 526. *Ver também* Retinol
  receptores para, 527
Ácido ribonucleico. *Ver* RNA
Ácido suberoilanilida hidroxâmico, 710
Ácido succínico, valor de pK/pKa , 14*t*
Ácido tauroquenodesoxicólico, síntese do, 256-257*f*
Ácido timnodônico, 142*t*
Ácido úrico, 326, 326*f*
  catabolismo das purinas na formação de, 338, 339*f*
  excreção diária do, 743
  valores de referência para, 727*t*
Ácido urônico, 596
Ácido valérico, 142*t*
Ácidos
  como doadores de prótons, 11
  conjugados, 12
  estrutura molecular afetando-força de, 14, 14*t*
  fortes, 11
  fracos. *Ver* Ácidos fracos
  polifuncionais, nucleotídeos como, 326
Ácidos anídricos, para o potencial de transferência de grupo, 327
Ácidos biliares (sais), 255-258
  na circulação êntero-hepática, 257-258
  na digestão e absorção de lipídeos, 519
  secundários, 256-257, 256-257*f*
  síntese de, 255-258, 256-257*f*
    regulação de, 256-257*f*, 257-258
Ácidos D-amino, livres, 20
Ácidos fortes, 11
Ácidos fracos, 14
  capacidade de tamponamento dos, 13-14
  constante de dissociação para, 12-13
  equação de Henderson-Hasselbalch descrevendo o comportamento dos, 13
  significado fisiológico dos, 12-13
  valores de pK/pKa dos, 14

Ácidos graxos, 3, 141
absorção do cálcio afetada por, 521
ativação dos, 208-209, 209-210*f*
eicosanoides formados-partir dos, 224-225, 225-226*f*
essenciais, 216-217, 222, 222*f*, 223-224
deficiência dos, 223-224
metabolismo anormal dos, 226-227
produção de prostaglandinas e, 224-225
interconvertibilidade dos, 158
livres. *Ver* Ácidos graxos livres
metabolismo dos, 152, 153*f*
não esterificados (livres). *Ver* Ácidos graxos livres
não saturados. *Ver* Ácidos graxos não saturados
nas membranas, 461
nomenclatura dos, 141, 141*f*
oxidação dos, 208-210. *Ver também* Cetogênese
aspectos clínicos dos, 214-215
hipoglicemia causada por deficiência dos, 214-215
liberação de acetil-CoA e, 152, 153*f*, 208-210, 209-210*f*
propriedades físicas/fisiológicas dos, 143
saturados, 141, 142*t*, 143
síntese dos, 216-219, 217*f*, 218*f*. *Ver também* Lipogênese
ciclo do ácido cítrico nos, 167-168, 168*f*
extramitocondrial, 219
metabolismo de carboidratos e, 152
na mitocôndria, 208-209, 209-210*f*
trans, 143, 223-225
transporte de, carnitina nos, 208-209, 209-210*f*
triacilgliceróis (triglicerídeos) como formas de armazenamento dos, 144, 144*f*
Ácidos graxos essenciais, 216-217, 222, 222*t*, 223-224
deficiência de, 223-224
metabolismo anormal dos, 226-227
produção de prostaglandina e, 224-225
Ácidos graxos essenciais nutricionalmente, 222. *Ver também* Ácidos graxos
deficiência dos, 223-224, 226-227
metabolismo anormal dos, 226-227
Ácidos graxos livres, 141, 207-208, 238*t*
insulina afetando, 246-247
lipogênese afetada por, 219-220, 221*f*
metabolismo da glicose afetando, 246-247
metabolismo do, 239-240
inanição e, 160*f*, 160*t*, 161
na esteatose hepática, 243-244
regulação da cetogênese e, 212-214, 213-214*f*
Ácidos graxos monoinsaturados, 141, 142*t*. *Ver também* Ácidos graxos; Ácidos graxos insaturados
dieta, níveis de colesterol afetados por, 257-258
síntese dos, 222-224, 223-224*f*
Ácidos graxos não esterificados. *Ver* Ácidos graxos livres
Ácidos graxos não saturados, 141, 142*t*. *Ver também* Ácidos graxos
eicosanoides formados-partir dos, 216-217, 224-225, 225-227*f*
essenciais, 222, 222*f*
deficiência dos, 223-225
metabolismo anormal dos, 226-227
produção de prostaglandinas e, 216-217
estruturas dos, 222*f*
ligações duplas *cis* nos, 143, 143*f*
metabolismo dos, 222
na dieta, níveis de colesterol afetados por, 257-258
nas membranas, 461, 461*f*, 463*f*
oxidação dos, 210
síntese dos, 222-224, 223-224*f*
Ácidos graxos ômega-3, 731
Ácidos graxos poli-insaturados, 142, 142*t*. *Ver também* Ácidos graxos; Ácidos graxos insaturados
dieta, níveis de colesterol afetados pela, 257-258
eicosanoides formados-partir dos, 224-225, 224-226*f*
essenciais, 222, 222*f*
síntese dos, 223-224, 223-224*f*
Ácidos graxos saturados, 141, 142, 142*t*
Ácidos graxos *trans*, 143, 223-225
Ácidos nucleicos. *Ver também* DNA; RNA
bases de, 324, 325*t*
digestão dos, 352
estrutura e função dos, 343
não essenciais na dieta, 332
Ácidos polifuncionais, nucleotídeos como, 326
Ácidos poli-insaturados C_{20}, eicosanoides formados-partir de, 224-225, 224-226*f*
Ácidos siálicos, 139, 139*f*, 146, 203, 204-205*f*
nas glicoproteínas, 139*t*, 570-571*t*, 571-572, 575*f*
nos gangliosídeos, 204-205*f*, 234-235, 234-235*f*
Ácidos urônicos, 139
Acidose
lática. *Ver* Acidose lática
metabólica, em amônia, 276-277
Acidose lática, 170
a partir de defeitos mitocondriais hereditários, 122
metabolismo do piruvato e, 176
deficiência de tiamina e, 534
Acidose metabólica, amônia na, 276-277
Acidúria
dicarboxílica, 215
metilmalônica, 189
orítica, 340
urocânica, 283
Acidúria orótica, 340
Acidúria urocânica, 283
Acidúria-dicarboxílica, 215
Acilcarnitina, 208-209, 209-210*f*
Acil-CoA: colesterol aciltransferase, 255
Acil-CoA desidrogenase de cadeia média, deficiência de, 215
Acil-CoA-desidrogenase, 117, 209-210, 209-210*f*
na ativação de ácidos graxos, 209-210*f*, 210
na deficiência de cadeia média, 215
na síntese do triacilglicerol, 230, 246, 246*f*
Acilglicerol, 229-230
Acilglicerol, metabolismo, 229-234
aspectos clínicos de, 234-235
catabolismo, 229-230
síntese, 230-234, 230*f*
no retículo endoplasmático, 156, 156*f*
Acondroplasia, 477*t*, 605-606*f*
Aconitase (aconitato hidratase), 164
Aconselhamento genético, 739-740
Acoplamento, 110, 110*f*
ATP no, 111
Acoplamento estímulo-resposta, membranas no, 459
Acoplamento receptor–efetor, 480-481
ACP. *Ver* Proteína carreadora de acil
ACTH. *Ver* Corticosteroide
Actina, 609, 667-668*t*, 668-669
Actina F, 610, 612
Actina G, 610
decoração de, 612, 612*f*
estrutura da, 610
na contração muscular, 610, 612-615
regulação do músculo estriado e, 614
Actina, filamentos (finos), 564-565, 609, 610*f*
Actina, filamentos, 626
Actina F, 610, 612
Actino-miosina, 611
Açúcar de nucleotídeo, 570-571
"Açúcar invertido," 117
Açúcares, 136-137. *Ver também* Carboidratos
aminas (hexosaminas), 136-137, 136-137*f*
classificação dos, 132-133, 133-134*t*
glicose como precursor dos, 203, 204-205*f*
inter-relação no metabolismo dos, 204-205*f*
nos glicoesfingolipídeos, 203, 204-205*f*
nos glicosaminoglicanos, 136-137, 203, 204-205*f*
desoxi, 136-137, 138*f*
isomerismo dos, 133-135, 133-135*f*
Açúcares de nucleotídeos, 574-575
ADA. *Ver* Adenosina desaminase
ADA bovina conjugada ao polietilenoglicol, 730
Adaptações homeostáticas, 499
Adenilil-ciclase, 502, 502*t*, 503, 733
derivada do AMPc, 181
na lipólise, 246-247, 247-248*f*
Adenilil-quinase (mioquinase), 113
como fonte de ATP no músculo, 623
na regulação da gliconeogênese, 191
Adenina, 325*t*, 326*f*
Adenosina, 325*t*
na formação do ácido úrico, 338, 339*f*
pareamento de bases no DNA, 344, 345*f*
syn e *anti*, conformadores de, 325*f*
Adenosina, monofosfato. *Ver* AMP
Adenosina, trifosfato, *Ver* ATP
Adenosina 3′-fosfato-5′-fosfosulfato, 327*f*, 328
Adenosina desaminase (ADA), deficiência, 339
estudo de caso, 729-730
Adenovírus, vírus associado, 438-439
Adesão celular, glicoesfingolipídeos na, 234-235
Adipócitos, 246-247
taxa de reposição, 686*t*
Adiposo, tecido, 140, 151, 246-247, 246*f*
ADP, 325*f*
consumo de glicose para, 158
energia livre da hidrólise de, 111
energia livre do catabolismo, captura por, 110, 127
marrom, 247-249, 249*f*
metabolismo em, 159*f*, 161*t*, 246-247, 246*f*
miosina, contração muscular e, 612, 624
no controle respiratório, 168
no estado de jejum, 160, 161
ADP, complexo chaperona, 559-560. *Ver também* Chaperonas
ADP, ribosilação, 535, 733, 734*f*, 735*f*
ADPase, 657, 659*t*
ADP-ribose, NAD como fonte de, 535
Adrenocorticotrópico, hormônio, 744
e hipercortisolismo, 725, 728, 728*t*
Adrenoleucodistrofia, neonatal, 554, 555*t*
Adrenoleucodistrofia neonatal , 554, 555*t*

Adutos, 687
Aeróbias, condições, 623
  ATP gerado por músculo, 623-624
Afinidade de SRP-R, para SRP, 556
AFP. *Ver* Alfafetoproteína
Agamaglobulinemia, 648
AGEs. *Ver* Glicação avançada, produtos finais
Agrecano, 605-606
Agrecano proteoglicano
  micrografia eletrônica de campo escuro do, 596
  representação esquemática do, 596*f*
Agregação, prevenção, 559-560
Agregados, formação de, 44
Água, 3, 7-9
  coeficiente de permeabilidade da, 463*f*
  como nucleófilo, 10-11
  como solvente biológico, 7, 8-9*f*
  dissociação da, 11
  estrutura biomolecular e, 8-10, 8-9*t*
  estrutura da, 8-9*f*
  nas ligações de hidrogênio, 7, 8-9*f*
Água corporal. *Ver* Água
AHG. *Ver* Fator anti-hemofílico/globulina
AHHs. *Ver* Hidroxilases de hidrocarbonos aromáticos
ALA. *Ver* Aminolevulinato
ALA sintase, 309
β-Alanil imidazol, 302
Alanina, 18*t*, 273-274, 298
  α-alanina, 285
  β-alanina, 302-303
  na formação do piruvato, 285
  pI de, 20-21
  síntese de, 267, 267*f*
Alanina aminotransferase, 66
  e icterícia, 722-723
  na síntese da ureia, 274-275, 274-275*f*
  para valores de referência, 727*t*
  significado diagnóstico de, 65*t*
Alanina transaminase. *Ver* Alanina aminotransferase
ALAS1 (ALA sintase hepática), 311
  na porfiria, 313*t*, 314
ALA-sintase eritroide (ALAS2), 311
  na porfiria, 313*t*
ALA-sintase hepática (ALAS1), 311
  na porfiria, 313*t*, 314
Albumina, 565-566, 595, 630-632
  em combinação com ácidos graxos livres, 207-208, 238*t*, 239-240, 632
  ligada à bilirrubina conjugada, 319
  ligada ao cobre, 640
  para valores de referência, 727*t*
Albumina:globulina, razão (razão A:G), 722-723
Albuminúria, 595
Alcalose, amônia em, 276-277
Alcalose metabólica, amônia na, 276-277
Alcaptonúria, 287
Álcool desidrogenase, 741, 742*f*
  na esteatose hepática, 244-245
Álcool etílico. *Ver* Etanol
Alcoolismo
  cirrose e, 243-244
  esteatose hepática e, 244-245
  glicosilação da transferrina em, 635-636
Aldeído-desidrogenase, 116
  na esteatose hepática, 246
Aldolases
  aldolase A, deficiência, 176
  aldolase B, 201, 203*f*
    deficiência de, 204-205
  na glicólise, 171, 172*f*
Aldose-redutase, 201, 203*f*, 205-206
Aldoses, 132-133, 133-134*t*, 134-135*f*
  estrutura do anel de, 133-134*f*
Alfa anômeros, 134-135
Alfafetoproteína, 632*t*
  como biomarcador tumoral, 714-715, 714-715*t*
Alfalipoproteínas. *Ver também* Lipoproteínas de alta densidade
  deficiência familiar de, 258-259*t*
Alfatocoferol. *Ver* Tocoferol
Alimento sólido, 733
Alinhamento de sequência múltipla, 99-101
Alongamento
  na síntese de proteínas, 404-405*f*
  na síntese do RNA, 379
Alongamento da cadeia. *Ver* Alongamento
Alopurinol, 328, 328*f*, 338, 340-341, 744
ALP. *Ver* Fosfatase alcalina
Alport, síndrome de, 592
ALT. *Ver* Alanina aminotransferase
Alta altitude, adaptação para, 54
Alteplase (ativador do plasminogênio tecidual/t-PA), 656, 656*f*
Alteplase. *Ver* Ativador do plasminogênio tecidual
Altitude, adaptação à alta, 54
Alzheimer, doença de, distúrbios afetivos e comportamentais em, 731
Amadori, produtos, 690
Amadori, rearranjo, 581
Ambiente extracelular, membranas na manutenção do, 460, 460*t*
Ambiente intracelular, membranas no manutenção do, 460, 460*t*
Ambiente prejudicado, para o ferro do heme, 49-50
Ambiguidade e o código genético, 396
Amido, 136-137, 137*f*
  hidrólise do, 518
  índice glicêmico do, 518
Amilases, 57
  na hidrólise do amido, 518
Amiloide, hipótese da cascata, 731
Amiloide-sérica, 643
Amiloidose, 643
Amiloidose familiar, 643
Amiloidose primária, 643
Amiloidose secundária, 643
Amilopectina, 137, 137*f*, 518
Amilopectinose, 181*t*
Amilose, 137, 137*f*
Aminoácido gliconeogênico, 273-274
Aminoácidos, 3, 18-23, 18*t*-19*t*, 274-275*f*. *Ver também* Peptídeos
  absorção de, 519-520
  análise/identificação de, 23
  biossíntese, 267
  cadeia ramificada, catabolismo de, 292-293, 294*f*
    distúrbios de, 293
  carga resultante de, 20-21, 20*f*
  catabolismo controla-biossíntese de carboidratos e lipídeos, 282-283
  cetogênicos, 158
  deficiência de, 265, 524
  degradação de proteína e, 272-273, 272-273*f*
  desaminação de. *Ver* Desaminação
  em peptídeos, 17, 22, 22*f*
  em proteínas, 18, 19
  excitatórios. *Ver* Aspartato; Glutamato glucogênico, 158
  glicose sanguínea e, 192
  hidrólise de ligações peptídicas, 685-686
  interconvertibilidade de, 158
  metabolismo de, 152*f*, 153, 154*f*. *Ver também* Esqueletos carbônicos de aminoácidos; Aminoácidos, nitrogênio
    fosfato piridoxal em, 536
  na catálise, conservação de, 63, 63*t*
  na gliconeogênese, 166, 167*f*
  necessidades de, 524
  no ciclo do ácido cítrico, 158
  nutricionalmente essenciais, 153, 266
  nutricionalmente não essenciais, 153, 266
    síntese de, 267-270
  ponto de solubilidade de, 21
  produtos derivados de, 297-305. *Ver também* produtos específicos
  propriedades de, 18-21
  reações químicas de, grupos funcionais, 22-23
  remoção da amônia-partir de, 274-275*f*, 275-276
  reposição de cetoácidos na dieta, 269
  sequência na estrutura primária, 22
  síntese, 266-270
    no ciclo do ácido cítrico, 166, 167*f*
    no metabolismo de carboidratos, 152
  sistemas transportadores/carreadores, hormônios que afetam, 469
  substituições, mutações de troca causadas por, 399, 399*f*
  transaminação de. *Ver* Transaminação
  trocas entre órgãos mantendo os níveis de circulação de, 272-274
  valores de pK/pKa de, 18*t*-16*t*, 20, 20*f*
    efeito do ambiente, 21
Aminoácidos, metabolismo, doenças metabólicas de, 284*t*
Aminoácidos, nitrogênio
  L-Aminoácido-oxidase, 116
  catabolismo de, 271-280
  L-Glutamato-desidrogenase em, 274-277, 275-276*f*
  no catabolismo dos esqueletos carbônicos dos aminoácidos, 282-283, 282-283*f*, 285*f*
  no metabolismo do nitrogênio, 274-277, 274-275*f*
  produtos finais de, 273-274
    ureia como, 276-279, 277-278*f*
  transaminação de, 274-275, 274-275*f*
Aminoácidos, sequências. *Ver também* Proteínas, sequência
  estrutura primária determinada por, 22
Aminoácidos α. *Ver também* aminoácidos em Proteínas, 17, 19*t*
  especificando o código genético, 18, 18*t*-19*t*
Aminoácidos cetogênicos, 158
Aminoácidos de cadeia ramificada, catabolismo de, 273-274, 292-293, 294*f*
  distúrbios de, 293
Aminoácidos essenciais. *Ver* Aminoácidos nutricionalmente essenciais
Aminoácidos essenciais nutricionalmente, 153, 524. *Ver também* Aminoácidos
Aminoácidos glicogênicos, 158
Aminoácidos livres, absorção dos, 521
Aminoácidos não essenciais nutricionalmente, 153, 265, 266*t*, 524
  síntese dos, 267-270

Aminoacil (A/aceptor), sítio, aminoacil-tRNA se ligando a, 403-404, 404-405*f*
Aminoacil, resíduos, 18, 22
  estrutura de peptídeos e, 22
Aminoacil-tRNA na síntese de proteínas, 403-404
Aminoacil-tRNA sintetases, 397, 397*f*
Aminoaçúcares (hexosaminas), 136-137, 136-137*f*
  em glicoesfingolipídeos, 203, 204-205*f*
  em glicosaminoglicanos, 136-137, 203, 204-205*f*
  glicose como precursora de, 203, 204-205*f*
  inter-relações no metabolismo de, 204-205*f*
L-α-Aminoadipato, 290*f*
L-α-Aminoadipato-δ-semialdeído, 290*f*
Aminofosfolipídeos, assimetria da membrana e, 464
β-Aminoisobutirato, 302
Aminolevulinato (ALA), 308, 310*f*
  na porfiria, 313
Aminolevulinato-desidratase, 308, 310*f*
  na porfiria, 313, 313*t*
Aminolevulinato-sintase, 308, 309, 310*f*
  na porfiria, 312*f*, 313, 313*t*
Aminopeptidases, 519
Aminotransferases, 167, 167*f*
  na biossíntese da ureia, 274-275, 274-275*f*
  significado diagnóstico de, 65*t*
Aminotransferases eritrocitárias, na avaliação do estado da vitamina B_6, 534
Amobarbital e fosforilação oxidativa, 122
Amônia
  detoxificação de, 275-276
  excesso de, 273-274
  fixação da glutamina sintase, 275-276, 275-276*f*
  nitrogênio removido como, 274-275*f*, 275-276
  no equilíbrio ácido-base, 276-277
Amônia, intoxicação, 275-276
Amônia, níveis sanguíneos e insuficiência hepática, 722-723
Amônio, íon, pK/pKa valor de, 14*t*
AMP, 325*f*, 325*t*, 326*f*, 333*f*
  cíclico. *Ver* AMP cíclico
  conversão para IMP, 332, 334*f*
  derivativos de coenzima de, 328*t*
  energia livre de hidrólise de, 112
  estrutura de, 326*f*
  regulação de retroalimentação, 334-336, 335*f*
  regulado por PRPP glutamil amidotransferase, 334, 335
AMP cíclico, 181, 181*f*, 327, 327*f*, 328*t*
  adenilil-ciclase afetando, 181, 502, 502*t*, 503
  como mensageiro secundário, 181
  contração do músculo liso afetada por, 621-622
  fosfoproteína, fosfatases e, 504
  na gliconeogênese, 190, 191, 191*f*, 194
  na regulação do metabolismo do glicogênio, 182-184, 183*f*, 184*f*
  proteinoquinases e, 503, 504
AMPc, 733, 734*f*, 735*f*. *Ver também* AMP cíclico
Ampicilina (Amp), genes de resistência, 438-439
Ampicilina, 438-439
Amplificação de genes, 701, 701*t*
Amplificação de sequência de DNA e sequenciamento de proteínas, 30-31
Anabolismo, vias anabólicas, 110, 151. *Ver também* Reações endoergônica; Metabolismo
Anafilaxia, substância de reação lenta de, 226-227
Analbuminemia, 633-634
Análise de ligação, 737
Análise de microarranjos das células cancerígenas, 714-715
Análogos da glutamina, síntese do nucleotídeo purina afetada por, 332, 334
Análogos da pirimidina, na biossíntese do nucleotídeo pirimidina, 338
Análogos de substratos, inibição competitiva por, 78
Análogos do estado de transição, 60
Anapleróticas, reações, no ciclo do ácido cítrico, 166
Âncora, 564-565
Ancorado ao glicosilfosfatidilinositol (ancorado ao GPI), 572-573
Ancoragem, 562, 564
  na importação nuclear, 552
Androgênios, aromatização periférica de, 485, 487
Androgênios, síntese, 484-485, 487, 484-485*f*
Anemia de células falciformes, 661*t*
Anemia de Diamond-Blackfan, 664
Anemia hemolítica sensível à primaquina, 665
Anemia megaloblástica
  deficiência de folato causando, 537
  deficiência de vitamina B_{12} causando, 538-539
Anemia perniciosa, 525
Anemia por deficiência de ferro, 661*t*
Anemias, 55
  causas de, 660, 661*t*
  deficiência de ferro, 521, 538-539, 638
  definição, 660
  hemolítica, 170, 176
    deficiência como causa de, 197, 203-204
    hiperbilerrubinemia/icterícia em, 318, 319*t*
    níveis de haptoglobina em, 633-634
    peroxidase e, 201, 201*f*
  megaloblástica
    célula falciforme. *Ver* Doença de células falciformes
    deficiência de folato como causa de, 538-539
    deficiência de vitamina B_{12} como causa de, 538-539
    perniciosa, 530*t*
  prevalência de, 660
Anemias hemolíticas, 170, 176, 204
  causas de, 665-666*f*
    cadeia possível de eventos na, 665*f*
    glicose-6-fosfato desidrogenase, deficiência, 197, 203-204, 665
  hiperbilirrubinemia/icterícia na, 318, 319*t*
  investigações laboratoriais, 665-666*t*
  níveis de haptoglobina na, 633-634
  peroxidase e, 201, 201*f*, 203
Anemias megaloblásticas, 661*t*
Aneuploidia, 706, 706*f*
Anfibólicos, vias/processos, 151
  ciclo do ácido cítrico e, 166
Angiogênese
  estimulação por células cancerosas, 711
Angioplastia coronária transluminal percutânea, 750
Angiotensina, enzima conversora de, 492
Angiotensina, inibidores de enzima conversora de, 494
Angiotensina II
  biossíntese, 492
  formação e metabolismo de, 493*f*
Angiotensinogênio, 492
Ângulo phi, 37
Ângulo psi, 36
Anidrase carbônica II (CA II), 604-605
Animais transgênicos, 447, 449
Ânion *gap* (hiato iônico), 739-740
  valores de referência para, 726*t*
Ânions tricarboxilatos, sistemas transportadores para regulação da lipogênese e, 221
Anômeros β, 134-135
Anormalidades peroxissomais, distúrbios devido a, 549*t*, 566-567
Anquirina, 667-668*t*, 668-669
Anserina, 299, 300*f*, 302
Antecedente de tromboplastina plasmática, 651*f*, 652, 652*t*
  deficiência de, 652
Antiangiogênse, agentes de, 715-716*t*
Antibióticos
  aminoaçúcares em, 136-137
  inibidores de folato como, 538-539
  síntese de proteínas bacterianas afetada por, 409
Antibióticos, tratamento, 730, 736, 748
Anticâncer, agentes, 714-716, 714-715*t*
Anticâncer, fármacos
  alvos para, 715-716*f*
  efeitos colaterais de, 715-716
Anticoagulantes (cumarínicos), 655
Anticódon, região do tRNA, 396, 398*f*
Anticonformadores, 325, 325*f*
Anticorpo, diversidade de, 646-647
Anticorpos, 629, 631. *Ver também* Imunoglobulinas
  monoclonais, hibridomas na produção de, 648
Anticorpos monoclonais, 715-716*t*
  e uso terapêutico em humanos, 648
  hibridomas na produção de, 648, 648*f*
Anticorpos monoclonais para VEGF, 711
Antifolato, fármacos, síntese de nucleotídeos purinas afetada por, 332, 334
Antígeno carcinoembrionário, 714-715, 715-716*t*, 721-722, 735, 736
Antígeno prostático específico, 714-715, 714-715*t*
Anti-hormonal, agentes, 715-716*t*
Antimaláricos, fármacos, inibidores de folato como, 538-539
Antimicina A, efeito na cadeia respiratória, 127
Antimicrossomais (peroxidase antitiroide), anticorpos, 725, 728
Antioxidantes, 119-120, 148
  retinoides e carotenoides como, 147, 526, 528-529
  vitamina C como, 148
  vitamina E como, 119-120, 148, 528-529
Antioxidantes, nutrientes, 543-546
Antioxidantes, propriedades, ácido úrico, 743
Antiportador ornitina-citrulina, defeituoso, 283
Antiporte, sistemas, 468, 469*f*, 571-572
α_1-Antiproteinase, no enfisema e na doença hepática, 641-642
Antiproteinases, 674, 675
Antiproteinases, inibidor de, 674
Antiquimiotripsina, 632*t*
Antirreceptor do TSH, anticorpos, 725, 728
Antitireoperoxidase, anticorpos, 747
Anti-TPO, anticorpos. *Ver* Antitireoperoxidase, anticorpos
Antitrombina/Antitrombina III, 632*t*, 654
  heparina se ligando a, 655
Antraciclina iodada, 643
Aorta, 594
  parede arterial, 601-602

Apagadores do código, 421
Aparelho de Golgi, 549, 571-572, 578
aparecendo para colapsar no RE, 564-565
glicosilação e, 564-565
lúmen do, 557
na classificação de proteínas, 549, 549*f*, 550
na formação doVLDL, 240*f*
na síntese da membrana, 549
proteínas destinadas à membrana do, 549, 557
transporte retrógrado-partir do, 557-559
Aparelho de Golgi no, 549
APC. *Ver* Proteína C ativada
Apo A-I, 238*t*, 239, 257-258
deficiências de, 258-259*t*
Apo A-II, 238*t*, 239
lipoproteína lipase afetada por, 240, 242
Apo A-IV, 238*t*, 239
Apo B-100, 238*t*, 239
no metabolismo de LDL, 241*f*, 240, 242
regulação de, 255
Apo B-100, receptor
no metabolismo de LDL, 240, 242
Apo B-48, 238*t*, 239
Apo C-I, 238*t*, 239
Apo C-II, 238*t*, 239
na atividade da lipoproteína lipase, 240, 242
Apo C-III, 238*t*, 239
lipoproteína lipase afetada por, 240, 242
Apo D, 238*t*, 239
Apo E, 238*t*, 239, 240, 242
Apo E, receptor
captação de quilomícrons remanescentes, 241*f*, 240, 242
no metabolismo de LDL, 240, 242-244, 244-245*f*
Apolipoproteínas/apoproteínas, 239-240
distribuição de, 238*t*, 239
oxigenação da hemoglobina afetando, 50
Apomioglobina, meio desfavorável para o ferro heme e, 49-50
Apoproteínas. *Ver* Apolipoproteínas/apoproteínas
Apoptose, 230, 233-234, 687, 731
características microscópicas de, 708
definição, 708
esquema de, 709*f*
modos das células cancerosas evitarem, 709-710
p53 e, 373-375
principais características de, 710*t*
versus necrose, 708
Apo-transcetolase, ativação de, na avaliação do estado nutricional de tiamina, 534
APP. *Ver* Proteínas precursores amiloides
Aquaporinas, 472
Arabinosil citosina (citarabina), 328, 329*f*
Aracnodactilia contratural congênita, 594
Arginase, 284*t*
distúrbios de, 279-280
na síntese de ureia, 285*f*
Arginina, 19*t*, 298
catabolismo de, 283, 285*f*
metabolismo de, 298*f*
na síntese da ureia, 283
Argininosuccinato, na síntese de ureia, 276-278, 277-278*f*
Argininosuccinato-liase
deficiência de, 279-280
na síntese de ureia, 276-277, 277-278*f*
Argininosuccínato-sintase, 279-280
deficiência de, 279-280
Argininosuccínica, 279-280
Armadilha do folato, 537*f*
ARS. *Ver* Sequências de replicação autônoma
Arsenato, oxidação e fosforilação afetadas por, 171
Arsenito, oxidação e fosforilação afetadas por, 176
Artrite gotosa, 338
Artrite reumatoide, 585, 589
Artropatia, da hemocromatose, 745
Ascorbato, 201, 201-202*f*, 546
Asialoglicoproteínas, receptores de
na inserção de cotradução, 556*f*, 557
Asma, leucotrienos em, 143
Asparagina, 19*t*
no catabolismo de nitrogênio dos aminoácidos, 282-283
síntese de, 267, 267*f*
Asparagina sintetase, 267, 267*f*
Asparginase, no catabolismo de nitrogênio dos aminoácidos, 275-277, 276-277*f*
Aspartato
catabolismo de, 282-283, 282-283*f*, 283
na síntese de ureia, 276-277
síntese de, 267, 267*f*
Aspartato 102, na catálise covalente, 62
Aspartato aminotransferase, 722-723
significado diagnóstico de, 65*t*, 66
valores de referência para, 727*t*
Aspartato transaminase. *Ver* Aspartato aminotransferase
Aspartato transcarbamoilase, 88
na síntese de pirimidinas, 337*f*, 338
Aspirina
ações antiplaquetárias da, 657, 659
ciclo-oxigenase afetada por, 224-225
síntese de prostaglandinas afetada por, 216-217
Assimetria
interna-externa, 464
ligação à importina e, 565-566
lipídeos e proteínas, formação de membrana e, 565-566, 566-567*f*
nas membranas, 464
Assimetrias regionais, membrana, 464
AST. *Ver* Aspartato aminotransferase
Ataxia telangiectasia, 373-374
ATCase. *Ver* Aspartato transcarbamoilase
Aterosclerose, 238, 657, 750
colesterol e, 146, 250, 257-258
concentração plasmática de LDL e, 242-243
fatores de risco para, 750
HDL e, 240, 242
hiper-homocisteinemia e suplementos de ácido fólico na prevenção de, 538-539
lisofosfatidilcolina e, 145
Ativação da protrombina em trombina, pelo fator Xa, 652-653
Ativação da transquetolase eritrocitária, na avaliação do estado nutricional da tiamina, 534
Ativador de *GAL1*, 429-431
Ativador do plasminogênio tecidual, 66, 656, 656*f*
Ativadores
na regulação da expressão gênica, 411-433, 412. *Ver também* Elementos intensificadores
Ativadores alostéricos, 191
Atividade da fosfatase alcalina sérica, 722-723
Atividade da histona acetiltransferase, 512
Atividade HAT. *Ver* Atividade da histona acetil-transferase
Atividade óptica/isômera, 133-134
Atlas de Sequências e Estruturas de Proteínas, 97-98
Atlas do Genoma do Câncer, 99
Átomos coplanares, característica parcial de ligação dupla e, 23
Atorvastatina, 258-259
ATP, 111-112, 325*f*, 327, 551, 552
a partir da energia livre de catabolismo, 127
a partir do controle respiratório, 127*t*, 128
controle respiratório na manutenção do fornecimento de, 168
degradação de proteína e, 272-273
energia livre de hidrólise de, 111, 112
fosforilação oxidativa, 623
hidrólise de
na contração muscular, 612, 624
por NSF, 564-565
na contração músculo/músculo, 609-610, 612, 615
múltiplas fontes de, 624*f*
na produção da oxidação de ácidos graxos, 208-210
na síntese de purinas, 332, 332*f*
na síntese e importação de proteínas mitocondriais, 559-560
na transferência de energia livre-partir de processos exoergônicos para endoergônicos, 111, 113*f*
no acoplamento, 111
no transporte ativo, 472-474, 473-474*f*
produção de pirofosfato inorgânico e, 113
síntese de
na produção da oxidação da glicose, 176, 177*t*
no ciclo do ácido cítrico, 164*f*, 166, 176, 177*t*
transporte de elétrons na cadeia respiratória, 125, 126*f*, 128*f*
ATPase, 472-474, 473-474*f*
chaperonas exibindo atividade de, 559-560
mutações no gene para o tipo P ligado ao cobre
doença de Menkes causada por, 641
doença de Wilson causada por, 641
no transporte ativo, 473-474, 473-474*f*
ATPase tipo P ligada ao cobre, mutações nos genes para
doença de Menkes causada por, 641
doença de Wilson causada por, 641
ATP-citrato liase, 168, 168*f*
acetil-CoA para lipogênese e, 219
ATP-sintase, 125, 126*f*, 128*f*
Atractilosídeo, na cadeia respiratória, 127, 128*f*
Atrofia girata da retina, 283
Ausência de enzimas ramificadas de, 181*t*
na biossíntese do glicogênio, 178-179*f*
Autoanticorpos da tireoide, 725, 728
Autoanticorpos para miastenia grave, 747
Autoassociação, interações hidrofóbicas e, 9-10
Autoconjuntos da bicamada lipídica, 462
Auto-oxidação. *Ver* Peroxidação
Autorradiografia, definição de, 450-451
Autotróficos, organismos, 111
Avidina, deficiência de biotina causada por, 540
5- ou 6-Azacitidina, 328
5′-Azadesoxicitidina, 710, 715-716*t*
8-Azaguanina, 328, 328*f*
Azatioprina, 328, 329*f*
5- ou 6-Azauridina, 328

B

BAC, vetor de. *Ver* Cromossomo artificial bacteriano (BAC), vetor de
Bactéria
  ciclo de transcrição em, 379
  intestinal, na desconjugação da bilirrubina, 316-317
Bactéria intestinal, no metabolismo de bilirrubinas, 316-317
Bacteriófago, definição de, 450-451
BAL. *Ver* Dimercaprol
Balanço nitrogenado, 523-524
Balanço nitrogenado negativo, 523-524
Balanço nitrogenado positivo, 524
BamHI, 435-437
Banco de dados, 96
Banco de dados de Genótipos e Fenótipos, 99
Banco de dados de mutações de genes humanos, 99
Banco de dados de proteínas, 97-98
Banco de dados *GeneCards* da transcrição genética, 99. *Ver também* Transcrição
Banco de dados HapMap, 98
Banco de genes, 97-98
Banco de genes, UniProt, e banco de dados de proteínas (PDB), 97-98
Banda A, 609
Banda de Soret, 311
Bandas H, 609, 610*f*
Bandas I, 608, 610*f*
Barbituratos, na cadeia respiratória, 127,128*f*
Base conjugada, 12
Base genética esporádica da doença de Alzheimer, 731
Bases
  como aceptores de prótons, 11
  conjugadas, 12
  fortes, 12
  fracas, 12
Bases de Schiff, 581
Bases fortes, 11
Bases fracas, 11
Becker, distrofia muscular de, 616, 739-740
Bence Jones, proteína de, 648
Benzo[a]pireno, estrutura, 700, 701*f*
Beriberi, 525
Bevacizumabe, 715-716*t*
BgIII, 435-436*t*
BHA. *Ver* Hidroxianisol butilado
BHT. *Ver* Hidroxitolueno butilado
Biblioteca, 451-452
Biblioteca de cDNA, 439-440
Biblioteca de DNA complementar (cDNA), 439-440
Biblioteca genômica, 439-440
Bicamada lipídica, 462-463, 462*f*
  proteínas de membrana e, 463-464
Bicamada lipídica, 463-464, 463*f*
  proteínas de membrana e, 463-464
Bicarbonato, 738-740
  em líquido extra e intracelular, 460*t*
Bicarbonato de sódio, 625
Bile, pigmentos, 316-317. *Ver também* Bilirrubina
Bile, secreção de bilirrubina para, 316, 316*f*
Bilirrubina
  acúmulo de (hiperbilerrubinemia), 317-320, 317*t*
  captação hepática de, 315-317, 316*f*
  catabolismo do heme produzindo, 314-315, 315*f*
  conjugação de, 316, 316*f*
  conjugada
    ligada à albumina e, 319
    redução para urobilinogênio, 316-317
  fecal, na icterícia, 319*t*
  glicuronidação de, 679-680
  não conjugada, distúrbios ocorrendo em, 318
  para valores de referência, 727*t*
  para valores normais, 319*t*
  secreção para bile, 316, 316*f*
  urina, na icterícia, 319, 319*t*
Bilirrubina conjugada
  ligada-albumina e, 319
  redução, para urobilinogênio, 316-317
Bilirrubina não conjugada, distúrbios ocorrendo da, 319
Biliverdina, 314, 315*f*
Biliverdina redutase, 314
Biocitina, 538-539
Bioenergética, 109. *Ver também* ATP
Bioengenharia, 4
Bioética, 4
Biofísica, 4
Bioinformática, 4, 95-96, 449-450
  biologia computacional, 99
  células virtuais, 102-103
  definição de, 5, 95-96
  desenho de fármacos com auxílio de computador, 101-103
  função de proteínas e, 33-34
  genomas e medicina, 95-96
  identificação de "proteínas desconhecidas", 100-101
  identificação de proteínas, 99
  Projeto Genoma Humano em, 95-96
  recursos genômicos para, 97-98
Biologia, 4
Biologia celular, 1
Biologia computacional, 99-104
  definição de, 99
  fontes genômicas para, 99
  genomas e medicina, 95-96
  Projeto Genoma Humano na, 95-96
Biologia da célula-tronco, 4
Biologia de sistemas, 4, 102-103
Biologia do desenvolvimento, objeto de teste para estudo, 694-695
Biologia Molecular, 30. *Ver também* DNA recombinante/Tecnologia do DNA recombinante
Biologia sintética, 4
Biomarcadores, 632
Biomarcadores tumorais, 714-715, 714-715*t*
Biomoléculas. *Ver também* reação de tipo específico com espécies reativas de oxigênio, 688*f*
  água afetando-estrutura de, 7-10
  estabilização de, 9-10
Bioquímica, 1-5
  como base de saúde/doença, 2-5
  definição de, 1
  métodos e preparações usados em, 2*t*
  Projeto Genoma Humano e, 4-5, 4*f*
  relação com-medicina, 1-3
Biossíntese da purina hepática, 334-336, 335*f*
  regulação da formação do AMP e GMP na, 335-336
  regulação do PRPP glutamil amidotransferase, 334, 335
Biossíntese de catecolaminas, 489*f*,
  dopa descarboxilase na, 489
  dopamina β-hidroxilase na, 489
  PNMT na, 489
  tirosina-hidroxilase na, 489
Biossíntese do nucleotídeo pirimidina, 336-337
  polipeptídeos multifuncionais na, 336, 337*f*
  regulação da, 338, 338*f*
  via para, 337*f*
Biotecnologia, 4
Biotina, 538-539
  como grupo prostético, 58-59
  deficiência de, 538-540
  na síntese de malonil-Coa, 217, 217*f*
BiP. *Ver* Proteína de ligação da cadeia pesada de imunoglobulina
2,3-Bisfosfoglicerato
  estrutura T da hemoglobina estabilizada por, 53
2,3-Bisfosfoglicerato fosfatase em eritrócitos, 174, 174*f*
Bisfosfoglicerato mutase na glicólise em eritrócitos, 174, 174*f*
BLAST, 99
  blastn, 99
  blastp, 99
  blastx, 100-101
BMR. *Ver* Taxa metabólica basal
Bolhas de replicação, 369-371, 370-371*f*
Bomba de sódio-potássio (Na^+-K^+-ATPase), 472-474, 473-474*f*
  no transporte de glicose, 473-474, 473-474*f*
Bombas, 460, 468*f*, 473-474
  no transporte ativo, 473-474, 473-474*f*
Bombas de prótons, 125
  cadeia respiratória como, 122
Botânica, 1
BPG. *Ver* 2,3-Bisfosfoglicerato
Braço aceptor de tRNA, 350, 350*f*, 398, 398*f*
Braço D do tRNA, 351, 397*f*, 398
Braço extra, do tRNA, 350, 351*f*, 351*t*
Brefeldina A, 565-566
Brotamento de vesículas, 562, 564-566
BSE. *Ver* Encefalopatia espongiforme bovina
BUN. *Ver* Nitrogênio ureico do sangue

C

Cabeça de miosina, 612, 620
  mudanças conformacionais na, na contração muscular, 612
CADD. *Ver* Desenvolvimento de fármacos auxiliado por computador
Cadeia do alongamento
  na síntese de ácidos graxos, 219, 221*f*
  no ciclo de transcrição, 379, 379*f*
Cadeia J, 647*f*
Cadeia respiratória, 121-131. *Ver também* Fosforilação oxidativa
  aspectos clínicos da, 130
  como bomba de próton, 122
  complexo de proteínas mitocondriais na, 116*t*, 122, 123*f*
  complexo III (ciclo Q) na, 122, 123, 125*f*
  complexo IV na, 122, 123*f*, 125
  complexos I e II na, 122, 123, 123*f*
  desidrogenases na, 117
  energia capturada no catabolismo-partir da, 113, 127, 177*t*
  flavoproteínas e proteínas ferro-enxofre na,122-123
  fosforilação oxidativa na, 125, 177*t*
  gradiente de proteína dirigindo-síntese de ATP-partir do transporte de elétrons na, 125, 126*f*, 128*f*

inibição do veneno da, 127-128, 128*f*
na mitocôndria, 123*f*
NADH-Q oxidorredutase como aceptor de elétrons na, 122, 123*f*, 165*f*
oxidação de equivalentes redutores na,122, 123*f*
substrato para, ciclo do ácido cítrico fornecendo,163-164, 164*f*
teoria quimiosmótica no controle da respiração e desacopladores na, 126*f*, 128
Cadeias de ácidos graxos, alongamento das, 219, 221*f*
Cadeias de oligossacarídeos, 631
Cadeias de poli-*N*-acetilactosamina, 578
Cadeias H. *Ver* Cadeias pesadas
Cadeias L. *Ver* Cadeias leves
Cadeias laterais, nas porfirinas, 307, 309*f*
Cadeias leves
imunoglobulina
genes produzindo, 646
rearranjo do DNA e, 364-365
Cadeias leves de imunoglobulinas, 643
genes produzindo, 646
rearranjo do DNA e, 364-365
Cadeias leves de miosina, 620
na contração do músculo liso, 620
Cadeias *N*-glicanas, 557
Cadeias pesadas
miosina, 620*f*
Cadeias pesadas de miosina, 611-612
miocardiopatia hipertrófica familiar causada por mutações no gene para, 620
Caderina-E, 712
Cafeína, 326, 327*f*
regulação hormonal da lipólise e, 246-247
Calbindina, 521
Calcidiol (25-hidroxicolecalciferol), no metabolismo da vitamina D, 532*f*
Calciferol. *Ver* Vitamina D
Calcineurina, 616
Calcinose, 531-532
Cálcio, 534, 735
absorção de, 521
metabolismo de vitamina D e, 521, 534
absorção de ferro afetada por, 522
mediador de ação hormonal, 505, 506
metabolismo da vitamina D afetado por, 530
metabolismo de
metabolismo da vitamina D e, 530
na ativação plaquetária, 657, 658*f*
na coagulação do sangue, 651, 651*f*, 653*t*
na contração muscular, 616
ativação da fosforilase e, 182
no músculo liso, 620
retículo sarcoplasmático e, 618-619
na hipertermia maligna, 615
no líquido extracelular, 460, 460*t*
no líquido intracelular, 460, 460*t*
Cálcio ATPase, 618-619
Cálcio/fosforilase quinase sensível à calmodulina, na glicogenólise, 182
Calcitriol ($1,25(OH)_2$-D_3), 531-532
biossíntese
na pele, 487-488
no fígado, 488
no rim, 488
como biomarcador tumoral, 714-715, 714-715*t*
concentração de cálcio regulada por, 531-532
Cálculos, 744
Cálculos biliares, 517
colesterol, 251
Caldesmona, 621
Calmodulina, 505, 620-621
fosforilase muscular e, 182, 183*f*
Calmodulina-4Ca^{2+}, na contração do músculo liso, 620-621
Calnexina, 559-560, 579
Calor, a partir da cadeia respiratória, 127
Calorias, 735, 736, 752
Calreticulina, 559-560
proteína do ER, 580
Calsequestrina, 614, 616
Camada de membrana bimolecular, 462-463. *Ver também* Bicamada lipídica
Caminhada dos cromossomos, 447, 449
CAMs (moléculas de adesão celular), 712, 712*t*
CAMs. *Ver* Moléculas de adesão celular
Canais de água, 472
Canais de cálcio no músculo cardíaco, 617-619
Canais de íons, 459, 469-471, 471*f*, 471*t*, 473-476, 618-619*t*
doenças associadas com distúrbios dos, 618-619*t*
no músculo cardíaco, 618-619, 618-619*t*
Canais de íons dependentes mecanicamente, 618-619*t*
Canais dependentes de ligante, 471, 618-619*t*
Canais dependentes de voltagem, 471-472, 618-619*t*
Canais iônicos dependentes, 471
Canal de cálcio tipo L, 618-619
Canal de condução de proteína, 556
Canal K^+, 471-472
Canalização, no ciclo do ácido cítrico, 164
Câncer, 543
agentes anticancerígenos para, 714-716, 714-715*t*
aspectos imunológicos de, 715-716
causas de, 699
disseminação, 711
envolvimento da mitocôndria no, 713-715, 714-715*f*
mecanismos epigenéticos, 710
metástase e, 711-714
oncogenes e genes supressores de tumor no, 701-704
origem clonal, 698-699
papel das células-tronco no, 710
predisposição hereditária para, 707
prevalência, 697-698
prevenção por fatores de risco modificáveis, 705, 705*t*
relação entre os fatores de crescimento de polipeptídeos com o, 705
tipos de, 697-698
Câncer colorretal
desenvolvimento do, 736
genes associados ao, 704*f*
genes de reparo de malapareamento no, 373-374, 373-374*f*, 373-375*t*
genes supressores do tumor e papel dos oncogenes no, 703, 704, 704*f*
estudo de caso, 734-736, 736*f*
Câncer de colo não polipoide hereditário, 735
reparo de malpareamento de genes no, 373-375*t*
Câncer dependente de hormônio, vitamina B_6 deficiência e, 536
Câncer do colo. *Ver* Câncer colorretal
Canelopatias, 618-619
CAP. *Ver* Proteína ativadora do gene catabólito
capacidade de ligação do ferro, total, 635-636
Capacidade de ligação total do ferro, 635-636
Caps, 561-562
Captação de energia, 111-112
Caquexia do câncer, 160, 173, 522
Carbamatos, hemoglobina, 52
Carbamoil fosfato
energia livre da hidrólise de, 112*t*
excesso, 340
na síntese da ureia, 276-277, 277-278*f*
Carbamoil fosfato sintetase
carbamoil fosfato sintetase I, 276-277
deficiência de, 278-279
na síntese da ureia, 276-277, 277-278*f*
carbamoil fosfato sintetase II, na síntese das pirimidinas, 336, 337*f*
Carboidratos, 132-139. *Ver também* Glicose; Açúcares; tipos específicos
classificação dos, 132-133, 133-134*t*
digestão e absorção dos, 518
interconvertibilidade dos, 158
isomerismo dos, 133-135, 133-134*f*
metabolismo dos, 152, 152*f*, 153*f*
doenças associadas aos, 132-133
vitamina B_1 no, 530*t*
na síntese de ácidos graxos, 157
nas lipoproteínas, 139
nas membranas celulares, 139
pouca perda de peso-partir de dietas com, 195
superfície celular e glicolipídeos, 132-133
Carboidratos da superfície celular, glicolipídeos e, 145
Carbono anomérico, átomo de, 134-135
Carboxibiotina, 538-539
Carboxipeptidases, 519
Carcinogênese, 698-699
Carcinogênese química, 699
estágios da, 700
Carcinogênio direto, 700*f*
Carcinogênio indireto, 700*f*
Carcinógenos químicos
direto e indireto, 700*f*
e câncer, 699-700
estruturas dos, 700*f*
interação com o DNA, 699
variedade dos, 699*t*
Carcinoide (argentafinoma), serotonina em, 300
Carcinoma de células escamosas, 756
Carcinoma hepatocelular, 745
Carcinomas pancreáticos, 707-708
Cardiolipina, 144*f*, 145
síntese da, 230, 230*f*, 232-233*f*
Cardiomiócitos, taxa de reposição dos, 686*t*
Cardiomiopatia hipertrófica, familiar, 618-620
Carga resultante, de aminoácidos, 20-21, 20*f*
Carioferinas, 553
Cariótipo, 359*f*
Carnitina
deficiência de, 207-208, 214-215
no transporte de ácidos graxos, 207-208, 209-210*f*
Carnitina palmitoiltransferase, 207-208
Carnitina palmitoiltransferase-I, 208-209, 209-210*f*
deficiência de, 214-215
na regulação da cetogênese, 213-214, 213-214*f*
Carnitina palmitoiltransferase-II, 208-209, 209-210*f*
deficiência de, 214-215
Carnitina-acilcarnitina translocase, 208-209, 209-210*f*

Carnosina, 303
Carnosinúria, 303
Caroteno, 546
Caroteno dioxigenase, 526
Carotenoides, 526. *Ver também* Vitamina A
Carotenoides provitamina A, 526
Carreadores de elétrons, coenzimas flavinas como, 535
Carregamento, na síntese de proteínas, 397, 397*f*
Cartilagem
componentes da, 604-606
doenças metabólicas e genéticas, 604-605*t*
principais proteínas da, 604-605*t*
representação esquemática da, 605-606*f*
Cartilagem hialina, proteínas principais da, 604-605
Cartilagem nasal bovina
diagrama esquemático da, 605-606*f*
Cascata da fosfatase, 481-482*t*
Caspases, 708
Catabolismo dos esqueletos carbônicos dos aminoácidos. *Ver* Esqueletos carbônicos de aminoácidos, catabolismo de
destino de, 282-283*t*
Catalase, 118, 664, 664*t*
como antioxidante, 148
no metabolismo do nitrogênio, 275-276, 275-276*f*
Catálise ácido/base específica, 60
Catálise ácido/base geral, 60
Catálise acidobásica, 60
Catálise covalente, 60, 74-75
frutose-2,6-bifosfatase na, 63
quimiotripsina na, 62, 74-75
Catálise/reações catalíticas (enzimáticas). *Ver também* Metabolismo
ácido-base, 60
protease do HIV na, 61
cinética das, 73-75
concentração de substrato e, 75
energia de ativação afetando, 71-73
equações equilibradas e, 70-71
estados de transição e, 78
fatores que afetam as taxas de, 72-73
inibição competitiva *versus* não competitiva e, 78
modelos de, 76
no desenvolvimento de medicamentos, 82
velocidade inicial e, 75
coenzimas/cofatores nas, 58-59
concentração do substrato que afeta-taxa das, 75
modelo de Hill da, 76
modelo de Michaelis-Menten da, 76
conservação dos resíduos e, 63
constante de equilíbrio e, 73-74
covalentes, 60, 74-75
frutose 2,6-bisfosfatase nas, 62*f*
quimiotripsina nas, 62, 74-75
deslocamento duplo, 81
deslocamento sequencial, 81
detecção de enzimas facilitada por, 63-65
especificidade das, 58-59
grupos prostéticos nas, 58-59
isoenzimas e, 63
mecanismos das, 60-61
grupos prostéticos/cofatores/coenzimas nos, 58-59
mutagênese dirigida por sítios no estudo dos, 68
no sítio ativo, 61-62
oxalacetato e, 163
pingue-pongue, 81
por proximidade, 60
por tensão, 60
reações Bi-Bi, 81-82
cinética Michaelis-Menten, 81
regulação das, 86-92, 157, 157*f*
alostérica, 87-88, 88*f*, 157*f*, 158
compartimentalização na, 85-87
constante de Michaelis (K_m) na, 85, 85*f*
covalente, 87, 89, 90*f*
fluxo de metabólitos e, 85, 85*f*
fosforilação-desfosforilação na, 90*f*, 91*t*
inibição de retroalimentação e, 87-88, 88*f*, 158
processos ativos e passivos na, 85, 85*f*
proteólise na, 89, 90*f*
quantidade enzimática e, 86-87
regulação de retroalimentação e, 88, 158
Catarata diabética, 205-206
Cataratas, diabéticas, 205-206
Catecolaminas. *Ver também tipo específico*
armazenamento de, 495*t*
biossíntese. *Ver* Biossíntese de catecolaminas
Catepsinas, na catálise acidobásica, 61
Cátion. *Ver também cátions específicos*
penetração na membrana por, 129
Cauda de poli(A), de mRNA, 349
na iniciação da síntese de proteínas, 403
Cavéola, 466
Caveolina-1, 466
Cavidade maior, no DNA, 345*f*, 346
modelo do óperon e, 413
Cavidade menor, no DNA, 345*f*, 346
CBG. *Ver* Globulina de ligação de corticosteroides
CBP. *Ver* Proteína de ligação ao CREB
CBP/p300 e vias de transdução do sinal, 512*f*
CDG. *Ver* Distúrbios congênitos da glicosilação
CDJ. *Ver* Doença de Creutzfeldt-Jakob
CDK- inibidor da ciclina/CDKI, DNA/integridade do cromossomo e, 373-375
CDKs. *Ver* Proteinoquinases dependentes de ciclina
cDNA para eritropoetina humana, 662
CDRs. *Ver* Regiões de determinação da complementariedade
CEA. *Ver* Antígeno carcinoembrionário
Cefalina (fosfatidiletanolamina)
assimetria da membrana e, 464
síntese da, 230, 230*f*
Cefalina (fosfatidiletanolamina), 144*f*, 145
Cegueira, deficiência de vitamina-causando, 525
Cegueira noturna, deficiência de vitamina-causando, 190*t*, 525
Célula, 1
no transporte macromolecular, 473-475, 473-476*f*
Célula apoptótica, programação de morte, 689
Célula-alvo
conceito de, 478-479
determinantes da concentração de hormônios na, 479*t*
Células cultivadas, 585
Células de leveduras, importação de proteína mitocondrial estudada na, 550
Células do mieloma, hibridomas crescendo-partir, 648, 648*f*
Células do músculo esquelético intercostal, taxa de reposição, 686*t*
Células endoteliais, 583
na coagulação e trombose, 657, 659*t*
Células fagocíticas, explosão respiratória das, 673
Células linfoides, 426-427
Células neoplásicas, 580, 584
análise de microarranjo das, 714-715
aneuploidia de, 706
anormalidades da apoptose, 708-710
anormalidades da membrana e, 477*t*
anormalidades do ciclo celular em, 706-707
bioquímica das, 713-714
ciclinas e, 371
colorretal, 734-736
deficiência de vitamina B_6 dependente de hormônio e, 536
efeito de Warburg nas, 713-714
estimulação da angiogênese por, 711
instabilidade genômica de, 706
isoenzimas de piruvato-quinase e glicólise nas, 713-714*f*
modos de evitar-apoptose, 709-710
mudanças bioquímicas e genéticas ocorrendo em, 698-699*f*
níveis elevados de atividade da telomerase em, 706
propriedades das, 697-698, 698-699*f*
propriedades metastáticas das, 580
sequenciamento do genoma completo, benefícios do, 707-708
taxa de glicólise aeróbia em, 713-714
Células sanguíneas. *Ver também* Eritrócitos; Neutrófilos; Plaquetas
importância funcional, 660
originadas de células-tronco hematopoiéticas, 660, 661
reações importantes em relação ao estresse oxidativo em, 664*t*
vias de diferenciação, 661, 662*f*
Células transfectadas na cultura, 427
Células virtuais, 102-103
Células-tronco, 730
papel no câncer, 710
Células-tronco da medula óssea, 730
Células-tronco hematopoiéticas, células sanguíneas derivadas-partir, 660, 661
Célula-tronco
definição, 660
potência, 660, 661
Celulose, 136-137
Centro Nacional de Informação de Biotecnologia (NCBI), 98
Centrômero, 358, 329*f*
Ceramida, 145, 145*f*, 233-235, 234-235*f*
síntese da, 233-235, 234-235*f*
Ceras, 141
Cérebro, metabolismo no, 161*t*
glicose como uma necessidade para, 158
Cerebrosídeos, 233-234
Ceruloplasmina, 632, 637
deficiência de, 635-636
significado diagnóstico de, 65*t*, 641
Cetoacidose, 207-208, 215
no diabetes melito, 161
Cetoacidose diabética, estudo de caso, 738-741
3-Cetoacil sintase, 218*f*, 219
Cetoaminas, 581
Cetogenêse, 153*f*, 156, 210-215. *Ver também* Ácidos graxos, oxidação dos
HMG-CoA na, 211-212, 212-213*f*
regulação da, 212-215, 213-214*f*

taxas elevadas de oxidação de ácidos graxos e, 210-213, 211-213*f*
α-Cetoglutarato, 283
no catabolismo dos esqueletos de carbono de aminoácidos, 282-283*f*
Cetonemia, 212-213, 739-740
Cetonúria, 215, 739-740
cadeia ramificada (doença da urina do xarope de bordo), 293
Cetonúria de cadeia ramificada (doença da urina em xarope de bordo), 292
disfunção do complexo de alfacetoácido descarboxilase em, 295*t*
Cetonúria de cadeia ramificada intermitente, 293
Cetose, 207-208, 212-213, 215
cetoacidose causada por, 215
na inanição, 215
na lactação, 161
não patológica, 215
no diabetes melito, 162, 215
no gado
esteatose hepática e, 243-244
lactação e, 215
Cetoses (açúcares), 132-133, 133-134*t*
CF. *Ver* Fibrose cística
CFTR. *Ver* Regulador transmembrana da fibrose cística
Chaperonas, 44, 558-560, 559-560*t*
atividade da ATPase, 559-560
histona, 357, 370-371
na ordenação de proteínas, 549, 566-567*t*
proteínas dependentes de ATP se ligando às, 551, 560-561
Chaperonas histonas, 357
Chaperonas moleculares. *Ver* Chaperonas
Chaperoninas, 44, 559-560
Chips, arranjo gênico, expressão de proteínas e, 33
Chips de arranjo do gene, expressão de proteína e, 33
Chips dos genes, 682-683
CI. *Ver* Instabilidade cromossômica
Cianida
na cadeia respiratória, 127, 128*f*
na fosforilação oxidativa, 122
Ciclinas, 371-372, 372*f*, 372*t*
Ciclinas A, 371, 372*f*, 372*t*
Ciclinas B, 372*f*, 372*t*
Ciclinas D, 371, 372*f*, 372*t*
câncer e, 371
Ciclinas E, 371, 372*f*, 372*t*
Ciclo celular
anormalidades nas células cancerígenas, 706-707
aspectos básicos do, 705
fase S do, síntese de DNA durante, 370-374, 372*f*, 372*t*
regulação, 560-561
Ciclo da calnexina, modelo de, 579
Ciclo da glicose-alanina, 192, 192*f*
Ciclo da hidroxilase, 119, 119*f*
Ciclo de células eucarióticas, versatilidade do, 91-92, 92*f*
Ciclo de Cori, 192, 192*f*
Ciclo de Krebs. *Ver* Ciclo do ácido cítrico
Ciclo do ácido cítrico, 113, 122, 158, 163-164, 164*f*, 165*f*
ATP gerado por, 164*f*, 166, 176, 177*t*
desaminação e, 166-167
dióxido de carbono liberado por, 163-164, 165*f*
equivalentes redutores liberados por, 164-166, 165*f*
gliconeogênese e, 166, 167*f*, 187-190, 188*f*
na mitocôndria, 155, 156, 156*f*
no metabolismo, 152, 152*f*, 153*f*, 155, 156*f*, 163, 166-167, 167*f*
aminoácido, 152*f*, 154*f*
carboidrato, 152, 152*f*, 166, 167*f*
lipídeos/ácidos graxos, 152, 154*f*, 167-168, 168*f*
no nível subcelular, 156, 156*f*
papel das vitaminas no, 166
regulação do, 168
substratos da cadeia respiratória fornecidos por, 163-164, 164*f*
transaminação e, 167,167*f*
Ciclo do ácido lático, 192, 192*f*
Ciclo do ácido tricarboxílico. *Ver* Ciclo do ácido cítrico
Ciclo do urobilinogênio êntero-hepático, 316
Ciclo Q, 123, 124*f*, 125*f*
Cicloheximida, 409
Cinética (enzima), 70-82. *Ver também* Catálise/reações catalíticas (enzimáticas)
concentração do substrato e, 75-78
modelos de efeitos da, 76-78
energia de ativação afetando a, 71-73
enzimas de multissubstratos e, 80
equações equilibradas e, 70-71
estados de transição e, 71-73
fatores que afetam-taxa de reação e, 72-74
inibição competitiva *versus* não competitiva e, 78-80
mudanças na energia livre afetando a, 72-73
no desenvolvimento de fármacos, 82
saturação, 77
sigmoide (equação de Hill), 77
velocidade inicial e, 75
Cinética de saturação, 77
substrato de sigmoide, equação de Hill na avaliação de, 78
Cinética de saturação do substrato sigmoide, equação de Hill na avaliação da, 78
Cinetócoro, 358, 705*f*
Cininogênio, alto peso molecular, 651*f*, 652
Cinurenina formilase, 291*f*, 292
Cinureninase, 291*f*, 292
Circuitos antiparalelos, mRNA e tRNA, 398
Circulação êntero-hepática, 257-258
absorção de lipídeos e, 519
Circular (conformação de proteínas), 38-39
Cirrose do fígado, 163, 244-245, 741, 745
Cistationa-β-sintase, 284*t*
Cisteína, 19*t*, 298
conversão para taurina, 299*f*
metabolismo da, 285-286, 287*f*
anormalidades da, 285, 286, 287*f*
na formação do piruvato, 285, 287*f*
requisitos para, 523-524
síntese da, 269, 269*f*
Cistidina trifosfato, 327
na fosforilação, 113, 114
Cistina-redutase, 285, 287*f*
Cistinose (doença de armazenamento de cistina), 286
Cistinúria (cistina-lisinúria), 285
Cístron, 413
Citarabina (arabinosil citosina), 328, 329*f*
Citidina, 325*f*, 325*t*
Citidina monofosfato, 325*t*, 570-571
Citocromo c oxidase, 122, 123*f*
Citocromo P450. *Ver* Sistema do citocromo P450
Citocromo P450 microssomal, 741
Citocromo P450 mitocondrial, 119, 677-678. *Ver também* Sistema do Citocromo P450
Citocromo-oxidase, 116
Citocromos
citocromo a_3, 116
citocromo b_5, 119, 558-559, 678-679
citocromo b_{558}, 673
como desidrogenases, 117
Citoesqueleto, funções celulares múltiplas, 626-627
Citoesqueleto/proteínas do citoesqueleto, 608
Citoquinas, 755, 755*f*
na caquexia, 160
Citosina, 325*t*
desoxirribonucleosídeos da, na síntese da pirimidina, 337-338, 339*f*
pareamento de bases no DNA, 345, 345*f*
Citosol, 557
glicólise no, 156, 156*f*, 170
lipogênese na, 216-219, 219-220*f*, 221
síntese da ALA no, 308, 310*f*
síntese da pirimidina na, 335
via das pentoses-fosfato, reações na, 197-200
Citrato
na regulação da lipogênese, 219-220
no ciclo do ácido cítrico, 163, 164*f*
Citrato-sintase, 164, 165*f*
Citrulina, na síntese da ureia, 276-277
Citrulinemia, 279-280
CK. *Ver* Creatinoquinase
Cl. *Ver* Cloro
Classificação de proteínas
aparelho de Golgi na, 549, 549*f*, 558-559
chaperonas e, 559-560
conjunto de membrana e, 550*t*, 564-565
distúrbios, mutações na codificação dos genes, 566-567
distúrbios dos peroxissomos/peroxissomo e, 552*t*, 554
hipótese do sinal de ligação do polirribossomo e, 550*f*, 555-557, 555*t*
importinas e exportinas na, 552, 553*f*
inserção cotraducional e, 556*f*, 557
mitocôndria na, 549, 550*f*
resposta à proteína desdobrada na, 559-560
sequência de aminoácidos KDEL e, 549*t*, 558-559
sequências de sinalização e, 548, 555*f*
transporte de vesículas e, 561-566, 562, 564*t*, 563*f*
transporte retrógrado e, 558-559
Clatrina, 473-474*f*, 475
Clivagem
da pré-albumina para-pró-albumina, 565-566*f*
da ubiquitina, 560-561
no sequenciamento de proteínas, 30
Clivagem da cadeia lateral do colesterol e estruturas básicas de hormônios esteroides, 483-484*f*
Clivagem proteolítica, 26*f*
Clofibrato, 258-259
Clonagem, 436-440
Clonagem de vetor, 438-439*t*
Clonagem posicional. *Ver* Análise de ligação
Clones na produção de anticorpo monoclonal, 648
Cloraminas, 674
Cloro
coeficiente de permeabilidade do, 463*f*
no líquido extracelular e intracelular, 460, 460*t*

Clorofila, 307
CMC. *Ver* Complexo modificador da cromatina
CMDs. *Ver* Distrofias musculares congênitas
CMP. *Ver* Citidina monofosfato
CMP- ácidos siálicos, 570-571, 571-572t
CNV. *Ver* Variações no número de cópias
CO. *Ver* Monóxido de carbono
CO_2. *Ver* Dióxido de carbono
Coagulação (sangue), 650
  avaliação dos testes laboratoriais da, 659
  formação do fibrinogênio na, 651, 651*f*, 653-654, 654*f*
  produtos de células endoteliais na, 657, 659*t*
  prostaglandinas na, 216-217
  proteínas envolvidas na, 651*f*, 653*t*. *Ver também* Fatores da coagulação
  via extrínseca da, 651, 651*f*, 653*t*
  via intrínseca da, 651, 651*f*, 652, 653*t*
  vias da, 651*f*
  vitamina K na, 532
    anticoagulantes cumarínicos que afetam, 655
Coagulação sanguínea, 651*f*. *Ver também* Coagulação (sangue); Coagulação, Fatores de
Coágulo sanguíneo. *Ver* Coagulação (sangue)
Coativadores, transcrição, 386, 388
Cobalamina, 537
  absorção da, fator intrínseco na, 521
  na acidúria metilmalônica, 789
Cobalofilina, 537
Cobalto, 537
Cobamida, coenzimas derivadas da, 59
Cobre, 540
  ceruloplasmina ligada ao, 635-636
  como cofator, 640
  enzimas que contêm, 640
  excesso, 640
  na doença de Menkes, 640
  na doença de Wilson, 640
  nas oxidases, 116
Codificação gênica para distrofina, 739-740
Código de açúcar da vida, 569-570
Código de histona, 422
Código epigenético de histona, 422
Código genético, 343, 396, 396*t*
  características do, 397, 397*t*
Código triplo, código genético como, 396*t*
Códon de parada, 405-407, 405-406*f*
Códons, 395, 396*t*
  sem sentido, 396
  sequência de aminoácidos da proteína codificada especificada por, 396
Códons sem sentido, 396, 399
Coeficiente de Hill, 78
Coeficiente de temperatura (Q_{10}), reações catalisadas por enzima, 74-75
Coeficientes de permeabilidade, de substâncias na bicamada lipídica, 463*f*
Coenzimas, 59
  derivadas de nucleotídeos, 327, 328*t*
  na catálise, 59
  síntese da coenzima A, 540
Cofator II da heparina, como inibidor da trombina, 655
Cofatores, 59
  na catálise, 59-60
  na coagulação do sangue, 651, 653*t*, 655
  na regulação do ciclo do ácido cítrico, 166
Colágeno, 45-46, 408
  classificação do, 590*t*
  condrodisplasia, 592, 604-606
  ligação cruzada do, 582, 754
  elastina diferenciada do, 593*t*
  estrutura da tripla-hélice do, 45-46, 45*f*, 589-590
  formação da fibrila por, 589-590
  genes para, 589, 590*t*
    doenças causadas por mutações no, 46, 592
  glicação do, 582
  interação celular, representação esquemática do, 595*f*
  maturação/síntese do, 46
    ácido ascórbico no, 46, 540
    distúrbios do, 46
  modificação pós-tradução do, 591-592
  mundo animal, proteína abundante, 590-593
  mutações, 592
  na ativação plaquetária, 657, 658*f*
  na cartilagem, 604-606, 604-605*t*
  no osso, 601-605
  osteogênese imperfeita, 602-604, 604-605*t*
  tipo I, 601-602
  tipo IV, 591, 592
  tipo IX, 592
  tipos de , 590*t*
  tipo V, 601-602
Colágeno tipo I, 601-602
Colágeno tipo IV, 591, 592
Colágeno tipo IX, 592
Colágeno tipo V, 601-602
Colágenos, 573
Colchicina, 744
Cólera
  estudo de caso, 733-734, 734*f*
  toxina, 234-235
  transporte de glicose no tratamento de, 473-474
Colesteril éster hidrolase, 254-255
Colesterol, 146, 147, 147*f*, 237, 519, 565-566
  na síntese do ácido biliar, 255-258, 256-257*f*
  na dieta, 251
  excesso de. *Ver* Hipercolesterolemia
  excreção de, 255-258, 256-257*f*
  nas lipoproteínas, 237, 239*f*
  nas membranas, 461
    modelo do mosaico fluido e, 466
  metabolismo de, 153, 153*f*
    aspectos clínicos de, 254-258, 258-259*t*
    variações diurnas de, 254
    lipoproteínas de alta densidade no, 240, 242-244, 242-243*f*
  níveis plasmáticos de
    aterosclerose e doença cardíaca coronariana e, 257-258
    mudanças na dieta que afetam, 257-258
    terapia medicamentosa que afeta, 258-259
    mudanças de estilo de vida que afetam, 257-258
    normal, 258-259
  síntese de, 251-254, 251*f*-253*f*
    acetil-CoA na, 152, 153*f*, 251-253, 251*f*, 253*f*
    metabolismo de carboidratos e, 152
    HMG-CoA redutase na regulação de, 254, 254*f*
  nos tecidos, 147, 147*f*
    fatores que afetam o equilíbrio de, 254-255, 255*f*
  transporte de, 255-256, 255-256*f*
    reverso, 242-243, 242-243*f*, 251, 255*f*, 257-258
Colesterol HDL, valores de referência para, 726*t*
Colesterol LDL, valores de referência para, 726*t*
Colesterol total, valores de referência para, 726*t*
Colicalciferol (vitamina D_3)
  no metabolismo da vitamina D, 529
  síntese na pele de, 529
Colil-CoA, na síntese do ácido biliar, 256-257, 256-257*f*
Colina, 144, 144*f*
  assimetria de membrana e, 464
  deficiência de, esteatose e, 243-244
  na síntese de glicina, 268, 268*f*
Colinesterase, 731
Colipase, 519
Combustíveis metabólicos, 158-161. *Ver também* Aspectos clínicos da digestão, 160-161
  dieta fornecendo, 522
  interconvertibilidade dos, 158-161
  necessidades diurnas para, 151
  no adulto normal, 151
  nos estados alimentados e de inanição, 158-161, 159*f*, 160*f*, 160*t*
  provisão dos, 151-162. *Ver também* Metabolismo
Compartimentação, 85-87
Complementar
  de DNA, 347*f*
  de RNA, 350, 351*f*
Complemento, 632
  na inflamação, 648
Complemento sérico, 472
Complexo da origem da replicação, 364-365
Complexo da tenase intrínseca, 652
Complexo de ácido graxo sintase, 217-219, 217*f*, 218*f*, 222
complexo de alfacetoácido descarboxilase de cadeia ramificada, 284*t*
Complexo de carboidratos. *Ver tipos específicos*
Complexo de clivagem da glicina, 285
Complexo de iniciação 43S, na síntese de proteínas, 401, 402*f*
Complexo de iniciação 80S, na síntese de proteínas, 402*f*, 403-404
Complexo de piruvato-desidrogenase, 175
Complexo de pré-iniciação, 379
  na síntese de proteínas, 401, 402*f*
Complexo de pré-iniciação 43S, na síntese de proteínas, 401, 402*f*
Complexo de reconhecimento da origem (ORC), 365
Complexo de ribonucleotídeo redutase, 336, 336*f*
Complexo de transcrição, eucariótico, 384*f*, 387-389
Complexo de transcrição eucariótico, 386-389
Complexo de vitamina B. *Ver também* vitamina específica
  coenzimas derivadas-partir do, 59
  no ciclo do ácido cítrico, 166
Complexo do fator tecidual, 651
Complexo eIF-E4, na síntese de proteínas, 403-404
Complexo enzima-substrato (ES), 61
Complexo ES. *Ver* Complexo enzima-substrato (ES)
Complexo modificador de cromatina, 423
Complexo receptor–correpressor, 501
Complexo receptor-ligante, 500-501, 500*f*
Complexo repressivo policomb 2 (PRC2), 422
Complexo Sec 61*p*, 556
Complexo sucrase-isomaltase, 518
Complexo tenase, 651, 652
Complexos de iniciação, na síntese de proteínas, 401, 402*f*

Complexos de poros nucleares, 552
Complexos de proteínas mitocondriais, na cadeia respiratória, 116*t*, 122, 123*f*
Complexos de translocação, 551
Complexos proteína-RNA, na iniciação, 401-404, 403*f*
Complexos siRNA-miRNA, 352
Componente de tromboplastina plasmática, 651, 651*f*, 652, 652*t*
  deficiência de, 655
  fármacos cumarínicos que afetam, 655
Componente P, na amiloidose, 643
Componente secretório, da IgA, 647*f*
Composições lipídicas do RE, 565-566
Comunicação célula-célula, por meio de junções *gap*, 475-476*f*
Comutação de isotipos (classe) , 647
ConA. *Ver* Concanavalina A
Concanavalina A, 139
Concentração do íon hidrogênio. *Ver também* pH
  taxa de reação catalisada por enzima afetada por, 74-75
Concentração reactante, taxa de reação química afetada por, 72-74
Concentrados de Fator VIII, tecnologia do DNA recombinante na produção de, 655
Condição autossômica recessiva, 730, 736, 745, 753, 756
Condições aeróbias, 623
Condições de triagem, fármacos, cinética enzimática nas, 82
Condições hereditárias do câncer, 707*t*
Condrodisplasias
  bases moleculares das, 605-606
Condroitina sulfato, 598
Condroitina sulfatos, 138*f*, 139, 601-602
Condronectina, 605-606
Conexina, 475-476, 475-476*f*
Conformação. *Ver também* substâncias específicas polipeptídeos/proteínas, 26*f*
  nativa, 43
Conformação nativa, proteína, 43
Conformações sin, 324*f*, 325, 325*f*
Conjugação
  com glutationa, 679-681
  de bilirrubina, 316, 316*f*
Conjunto de membrana, 555
Conjuntos não covalentes, nas membranas, 460
Conservação de energia, 113
Constante catalítica, 77
Constante de dissociação, 11
  constante de Michaelis (K_m) e, 76
  de ácidos fracos, 11
  no cálculo do pH, 11
Constante de equilíbrio, 73-74
  mudanças de energia livre e, 72-73
  na catálise enzimática, 73-74
Constante de ligação, aproximando-se da constante de Michaelis (K_m), 77
Constante de Michaelis, 76
  constante de ligação aproximada pela, 77
  efeitos alostéricos na, 88
  inibidores afetando, 79
  taxa de catálise enzimática e, 76, 85, 85*f*
Constante dielétrica de água, 8-9
Constantes de velocidade, 73
Contração muscular, 609-615
  fase de relaxamento da, 613, 614
  hidrólise do ATP na, 612
  modelo de ponte cruzada do filamento deslizante da, 609-610
  no músculo liso, 620-622, 621*f*
    quinase de cadeia leve de miosina na, 621
  óxido nítrico na, 622-623
  papel do cálcio na, 616
    ativação da fosforilase, 182
    músculo liso, 620
    retículo sarcoplasmático, 618-619
  regulação da
    baseada na actina, 614
    cálcio na, 614
  retículo sarcoplasmático e, 614-615
  tropomiosina e troponina na, 613-614
Contratilidade/contração. *Ver* Contração muscular
Controle respiratório, 110, 168
  fornecimento de ATP-partir do, 127*t*, 128
  teoria quimiosmótica no, 126*f*, 128
Controles de pontos de verificação, 373-375
Conversão gênica, 364
Coproporfirinas, 309*f*, 311
  espectrofotometria para detecção de, 311-312
Coproporfirinogênio I, 308, 310*f*-312*f*
Coproporfirinogênio III, 308, 311*f*, 312*f*
Coproporfirinogênio-oxidase, 309, 311*f*, 312*f*
  na porfiria, 313*t*
Coprostanol (coprosterol), 256-257
Coração
  deficiência de tiamina afetando, 525
  metabolismo no, 161*t*
Corante vermelho Congo, 643
Corpos cetônicos, 152, 153*f*, 155, 207-208, 211-212*f*
  ácidos graxos livres como precursores dos, 212-213
  como combustível para os tecidos extra-hepáticos, 211-213, 213-214*f*
  na inanição, 160*f*, 160*t*, 161
  no estado de jejum, 161
Corpos de Heinz, 665
Corpos P, 406-407*f*, 408-409
Correguladores do receptor nuclear
  e transcrição, 511-513
  proteínas de corregulador de mamíferos, 513*t*
Corrinoides, 537. *Ver também* Cobalamina
Cortes/selagem do corte, na replicação do DNA, 370-371, 371*f*
Corticosteroide, 744, 755*f*
Corticotropina. *Ver* Corticosteroide
Cosmídeos, 436-439
Cotromboplastina (fator VII), 651, 651*f*
  fármacos cumarínicos que afetam, 655
  na inibição da coagulação do sangue, 651, 652*t*
Coxibes, 224-225
CPT-I. *Ver* Carnitina palmitotransferase-I
CRE. *Ver* Elemento de resposta ao AMP cíclico
Creatina, 302, 304*f*
Creatinina, 302, 304*f*
  como marcador da função renal, 723-724
  valores de referência para, 726*t*
Creatinofosfato, 298*f*, 302, 304*f*, 624
  energia livre da hidrólise de, 112*t*
  no músculo, 625*t*
Creatinoquinase, 624
  significado diagnóstico de, 65, 739-740
CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico), 504
Cretinismo, 747
Crioprecipitados, tecnologia do DNA recombinante na produção de, 655
Criptoxantina, 526
Cristalografia por raios X, estrutura da proteína demonstrada por, 40-43
Cristalografia por raios X de Laue, 42-43
Cromátides
  compactação de nucleoproteínas nas, 358, 359*t*
  irmãs, 358, 359*f*
    trocas entre, 364, 364*f*
Cromátides-irmãs, 358, 359*f*
  permutação, 364, 364*f*
Cromatina, 355-357, 356*f*, 357*t*
  estruturas de ordem superior/compactação de, 357, 358*f*
  inativa, 358
  reconstituição na replicação do DNA, 370-371
  regiões ativas *versus* inativas de, 358, 358*f*
  remodelamento na expressão do gene, 420
Cromatina ativa, 358, 358*f*, 419
Cromatografia. *Ver também* tipo específico de afinidade
    para purificação de proteína de fusão recombinante, 67
    para purificação de proteínas/peptídeos, 28
  para purificação de proteínas/peptídeos, 26-29
Cromatografia de afinidade
  na purificação de proteínas de fusão recombinante, 67
  para purificação de proteínas/peptídeos, 28-29
Cromatografia de alta pressão de fase reversa, para purificação de proteína/peptídeo, 30
Cromatografia de coluna, para purificação de proteína/peptídeo, 26
Cromatografia de exclusão de tamanho, para purificação proteína/peptídeo, 26, 27, 28*f*
Cromatografia de interação hidrofóbica, para purificação proteína/peptídeo, 27-28
Cromatografia de partição, para purificação de proteínas/peptídeos, 26
Cromatografia de troca de íons, purificação de proteínas/peptídeos por, 27
Cromatografia líquida, 26, 27*f*
Cromatografia líquida de alta eficiência
  fase reversa, para purificação de proteína/peptídeo, 26-27
Cromatografia por absorção, para purificação de proteína/peptídeo, 26
Cromo, 541*t*
Cromossomo artificial bacteriano (BAC), vetor de, 438-439
Cromossomo politeno "Puffs", 358, 358*f*
Cromossomos, 358-360, 359*t*, 360*f*
  integridade dos, monitoramento, 373-375
  interfase, fibras de cromatina nos, 357
  metáfase, 358*f*, 359, 359*t*
  politênicos, 358, 358*f*
Cromossomos de interfase, fibras de cromatina no, 357
Cromossomos em metáfase, 358, 359, 359*f*, 359*t*, 362-363, 363-364*f*
Cromossomos politenos, 358, 358*f*
Crossing over, na recombinação cromossômica, 363-364, 363-364*f*
CRP. *Ver* Proteína reguladora de catabólitos; Proteína C reativa
Cruzamento desigual, 363-364, 363-364*f*
CSF. *Ver* Fator estimulador de colônia
CT (calcitonina)
  como biomarcador tumoral, 714-715, 714-715*t*
CT. *Ver* Calcitonina
Cumarina, 655

Curva de dissociação do oxigênio, para mioglobina e hemoglobina, 50
Curvaturas (conformação proteica), 38-39, 40*f*

D

DAF. *Ver* Fator de aceleração do decaimento
dAMP, 326*f*
Dano à proteína, reparo do, 692
Dano do DNA
  por agentes ambientais, 699
  por energia radiante, 699
Dano genético, causas de, 698-699
Dano redox mitocondrial, 689
Dantroleno para hipertermia maligna, 615
dATP, 730
dbGAP. *Ver* Banco de dados de Genótipos e Fenótipos
Debrisoquina, 678-679
Decisão de classificação principal, 548
Dedo de zinco, 428-429
Dedos de zinco, 429-430
Defeitos de desenvolvimento cardíaco, 620
Defeitos do tubo neural, suplementos de ácido fólico na prevenção dos, 537
Defensinas, 670-671*t*
Defesa do corpo contra infecção bacteriana, papel dos neutrófilos em, 672
Deficiência da adesão de leucócitos (LAD) II, 584
Deficiência de 3-cetoacil-CoA tiolase, 215
Deficiência de adesão de leucócitos tipo I, 673
Deficiência de carnosinase, 303
Deficiência de ferro/anemia por deficiência de ferro, 521
Deficiência de fosforilase do nucleotídeo purina, 339
Deficiência de fosforilase hepática, 181*t*
Deficiência de miofosforilase, 181*t*
Deficiência de ornitina transcarbamoilase/L-ornitina transcarbamoilase, 279-280, 340
  na síntese da ureia, 276-277
Deficiência de piruvato-quinase (PK), 661*t*
Deficiência de proteínas, 749*f*
Deficiência de sulfatase múltipla, 235
Deficiência de uridil transferase, 205-206
Deficiência neurológica profunda, 554
Deficiências nutricionais, 517
  na Aids e no câncer, 522-524
Degeneração do código genético, 396
Degeneração hepatolenticular (doença de Wilson), 477*t*, 641
  mutações de genes na, 477*t*, 640
  níveis de ceruloplasmina na, 641
Degradação, de vírus, 561-562
Degradação associada ao retículo endoplasmático (ERAD) de proteínas dobradas de modo inapropriado, 559-560, 561-562*f*
Degradação de proteínas
  dependente de ATP e ubiquitina, 272-273
  independente de ATP, 272-273
Degradação de proteínas, ubiquitinas na, 560-562, 561-562*f*
Degradação de proteínas teciduais, 625
Deleções e duplificações gênicas, 739-740
Demência, 731
Depuração de complexos antígeno-anticorpo, 649
Depuração de creatinina, 723-725
Depuração de inulina, 724-725
Depurinação, DNA, reparo de excisão de base e, 373-374
Derivados de colesterol, 482-483*f*
Derivados de tirosina, 482-483*f*
Desacopladas/ proteínas desacopladas
  desnutrição e, 523-524
  na cadeia respiratória, 126*f*, 127-128
Desaminação, 153, 154*f*
  ciclo do ácido cítrico na, 166
  fígado na, 154
Desaminação oxidativa, 274-275*f*
Desassociação, 564-565
  de feixe de quatro hélices, 564-565
Descarboxilação do *S*-adenosilmetionina, 300
Descoberta de fármacos, ensaios enzimáticos adequados para triagem em alta escala na, 64
Desenvolvimento de fármacos
  alvos do RNA para, 352
  cinéticas enzimáticas, mecanismo, e inibição no, 82
Desenvolvimento de fármacos auxiliado por computador, 101-103
Desfibriladores, 471, 471*f*
Desfosforilação. *Ver também* Fosforilação, proteína
  na modificação covalente, 91, 91*t*
Desidrocolesterol, no metabolismo da vitamina D, 526
Desidroepiandrosterona, 484-485, 487
Desidrogenases, 116-117, 118*f*
  coenzima dependente de nicotinamida, 117, 118*f*
  dependente de riboflavina, 117
  na cadeia respiratória, 116-117
  na detecção de enzimas, 65, 66
Desidrogenases dependentes de $NAD(P)^+$, na detecção de enzimas, 64
Deslocação, 560-561
Deslocamento isomórfico, 42
Desmina, 616
Desmosterol, na síntese do colesterol, 253, 253*f*
Desnaturação
  análise da estrutura do DNA e, 345
  redobramento de proteínas e, 43
  temperatura e, 74-75
Desnutrição, 517, 522
Desnutrição proteína-energia, 747-749
Desoxi açúcares, 136-137, 136-137*f*
Desoxiadenilato, 343
Desoxicitidilato, 343
Desoxiguanilato, 343
Desoxi-hemoglobina
  desoxi-hemoglobina S, receptor da placa viscosa na, 55*f*
  ligação de prótons por, 53
Desoxi-hemoglobina A, receptor da placa viscosa na, 53, 55*f*
Desoxinorijimicina, 580
Desoxinucleotídeos, 343-345
Desoxirribonucleases (DNase)/DNase I, 352
  cromatina ativa e, 357
Desoxirribonucleosídeos, 324
  na síntese de pirimidina, 337-338
Desoxirribose, 132-133, 136-137, 136-137*f*
3-Desoxiuridina, 328
Despolarização, na transmissão do impulso nervoso, 473-474
Dessorção à *laser* assistida por matriz (MALDI), em espectrometria de massa, 31, 33*f*
Destoxificação, sistema do citocromo P450 no, 119, 119*f*
Destoxificação de fármacos/interações, citocromos P450 e, 119, 119*f*
Desvio da hexose monofosfato. *Ver* Via das pentoses-fosfato
Detergentes, 461, 462
Determinante antigênico (epítopo), 38
Dextrina limite, 181*t*
Dextrinas, 137
Dextrinose limite, 181*t*
Dextrose, 133-134
Dextrose-salina intravenosa, 748
DHA. *Ver* Ácido docosahexaenoico
DHEA. *Ver* Desidroepiandrosterona
DHPR. *Ver* Receptor de di-hidropiridina
DHT. *Ver* Di-hidrotestosterona
Diabetes bronzeado, 745
Diabetes insípido nefrogênico, 472
Diabetes melito, 132-133, 194, 238, 582, 751, 757*t*
  cetose/cetoacidose no, 214-215
  como doença metabólica, 151
  dano tecidual no, 581
  esteatose hepática e, 243-244
  hiperglicemia no, 161-162
  lipogênese no, 216-217, 219-220
  níveis de ácidos graxos livres no, 240
  transporte de lipídeos e distúrbios de armazenamento, 238
Diabetes melito insulino-dependente, 195. *Ver também* Diabetes melito
Diabetes melito não insulino-dependente, 195
Diabetes melito tipo 1, *Ver* Diabetes melito insulino–dependente
Diacilglicerol, 144, 519
  formação do, 230*f*
  na ativação plaquetária, 657, 658*f*
Diacilglicerol-aciltransferase, 230, 231*f*
Diagnósticos laboratoriais dos distúrbios da tireoide, 725, 728*t*
Diarreia, 587
  transporte de glicose no tratamento de severa, 473-474
Dicumarol (4-hidroxidicumarina), 532
Dieta. *Ver também* Nutrição
  carboidrato muito baixo, perda de peso-partir de, 195
  muito gordurosa, esteatose hepática e, 243-244
  níveis de colesterol afetados por, 257-259
  regulação da glicose no sangue e, 192
  secreção de VLDL hepático e, 243-244, 244-245*f*
Dieta de alta caloria, 736
Dieta vegetariana, deficiência de vitamina B_{12} e, 537
Dietas de muito pouco carboidrato, perda de peso-partir de, 195
Dietilenotriaminapentacetato (DTPA), como antioxidante preventivo, 148
Diferenciação tissular, ácido retinoico na, 527-529
Difosfatidilglicerol. *Ver* Cardiolipina
Difosfato de dimetilalil, na síntese do colesterol, 251, 252*f*
Difosfato de farnesil, na síntese do colesterol/poliisoprenoide, 251, 252*f*, 253-254
Difosfatos, nucleosídeo, 324, 325*f*
Difosfatos de desoxirribonucleosídeos
  redução dos NDPs para, 339, 339*f*
Difosfatos de ribonucleosídeos, 336, 336*f*
Difração e cristalografia por raios X, estrutura da proteína demonstrada por, 40-42
Difusão
  facilitada, 44, 467, 467*t*, 468-469, 468*f*, 470*f*
    de bilirrubinas, 316
    de glicose. *Ver também* Transportadores de glicose

insulina afetando, 473-474
na membrana da hemácia
hormônios na regulação de, 469
modelo de Pingue-Pongue, 469, 470*f*
passiva, 467*t*-469*f*
rede, 468*f*
simples, 467*t*, 468*f*
Difusão simples, 467, 467*t*, 468*f*
Difusão/transporte passivo, 467, 467*t*, 468, 468*f*, 469*f*
Digestão, 518-519
Digital, 473-474
Na^+-K^+-ATPase afetada por, 473-474
permutador de Ca^{2+}-Na^+ na ação do, 618-619
Di-hidrobiopterina, defeito na síntese de, 288
Di-hidrobiopterina redutase, defeito na, 288
Di-hidrofolato/di-hidrofolato redutase
metotrexato afetando, 338, 538-539
Di-hidrolipoamida desidrogenase, 295*t*
Di-hidrolipoil desidrogenase, 174, 175*f*
Di-hidrolipoil transacetilase, 174, 175*f*
Di-hidrotestosterona, 485, 487, 486*f*
Di-hidroxiacetona, 135*f*
24,25-Di-hidroxivitamina D3 (24-hidroxicalciol), no metabolismo da vitamina D, 529
Di-iodotirosina, 490
Dimercaprol, 127, 128*f*
Dímero de histona, 355, 356
Dímeros
histona, 356
proteína *Cro*, 417, 417*f*
proteína repressora lambda (*cI*), 417, 417*f*
Dímeros de timina, 756
Dimetilaminoadenina, 326*f*
Dinâmicas moleculares, 43
Dinamina, na pinocitose absortiva, 475
Dineínas axonemais, 627
2,4-Dinitrofenol, 127
Dinucleotídeo, 328, 329
Dióxido de carbono
ciclo do ácido cítrico na produção do, 163-164, 165*f*
transporte do, pela hemoglobina, 52
Dioxigenases, 118
Dipeptidases, 519
Dipeptídeos β-Alanil, 302-304
Dipolos, água formando, 7, 8-9*f*
Disbetalipoproteinemia familiar, 258-259*t*
Disfunção endotelial, 750
Dislipoproteinemias, 258-260, 258-259*t*
Displasia, 736
Displasia tanatofórica, 605-606
Dissacaridases, 518
Dissacarídeos, 132-133, 136-137, 136-137*f*, 137*t*. *Ver também* tipo específico
Dissociação da água, 11
Dissociação induzida pela colisão, na espectrometria de massa, 31
Dissociação ribossomal, na síntese de proteínas, 401
Distrofia muscular, Duchenne, 608, 616-617, 739-741
Distrofia muscular de Duchenne, 446-447, 616-617
estudo de caso, 739-741
Distrofias musculares congênitas, 585
Distrofina, 608, 616-617, 739-741, 741*f*
Distúrbios conformacionais, 566-567
Distúrbios congênitos da glicosilação, 584, 635-636
Distúrbios da tiroide, diagnóstico laboratorial das, 725, 728*t*
Distúrbios de deficiência do complemento, 649
Distúrbios do armazenamento de lipídeos (lipidoses), 234-235, 235*t*
Distúrbios do ciclo da ureia, 278-279
Distúrbios ligados ao X, RFLPs no diagnóstico de, 446-447
Distúrbios psiquiátricos, 733
DIT. *Ver* Di-iodotirosina
Diversidade
anticorpo, 646-647
combinatória, 646
juncional, 647
Diversidade combinatória, 646
Diversidade juncional, 647
DMT1. *Ver* Transportador de metal divalente
DNA, 344-345, 354-375, 370-371, 371*f*
cavidades no, 345*f*, 346
complementariedade do, 346, 347*f*, 439-440
cromossomal, 356*f*, 359*t*, 360*f*
dano ao, 373-374*f*, 373-375, 373-375*t*
reparo do, 373-375, 373-375*t*
de fita dupla, 344-346, 346*f*, 347
despurinação e reparo da excisão de bases, 373-374
estabilização do, 9-10
estrutura do, 343-346, 344*f*, 345*f*
desnaturação na análise do, 345
dupla-hélice, 9-10, 344-345, 345*f*
extremidade cega, 436-438
forma relaxada do, 346
informação genética contida no, 343-346
mitocondrial, 362-363, 362-363*f*, 362-363*t*
monitoramento da integridade, 373-375
mutações no, 354, 362-365. *Ver também* Mutações nos nucleossomos, 355, 355*f*, 356, 357, 358*f*
na cromatina, 356*f*, 357-358, 357*t*, 358*f*
na síntese do RNA, 377-381
pareamento de bases no, 9-10, 343-345, 345*f*
correspondência de para renaturação, 345-346
tecnologia do DNA recombinante e, 434-443
rearranjos do
na diversidade de anticorpos, 364
recombinante. *Ver* DNA recombinante/tecnologia do DNA recombinante
regiões de codificação do, 360, 360*f*
relação com mRNA, 360*f*
renaturação do, correspondência de pares de bases e, 345-346
reparo da excisão de bases do, 373-374, 373-374*f*, 373-375*t*
reparo da quebra da fita dupla do, 373-375, 373-375*t*, 375*f*
reparo de excisão do nucleotídeo do, 373-374, 373-374*f*, 373-375*t*
reparo de malpareamento do, 373-374, 373-374*f*, 373-375*t*
reparo do, 373-375, 373-375*t*, 560-561
replicação/síntese do, 346, 347*f*, 364-375, 364-365*t*, 366*f*, 372*t*
complexo da DNA-polimerase na, 367, 369*t*
duração do reparo, 373-375, 373-375*t*
formação da bolha de replicação e, 369-371, 370-371*f*
formação do garfo de replicação e, 366, 366*f*
iniciação da, 368*f*
na fase S do ciclo celular, 370-374, 372*f*
natureza semiconservativa do, 347, 347*f*
origem da, 364-365
primer de DNA na, 366*f*
primer de RNA e, 364-365*t*, 366
reconstituição da estrutura da cromatina e, 370-371
redução do ribonucleosídeo difosfato e, 336
semidescontínuo, 366*f*, 368*f*, 369
ribosilação do ADP para, 535
sequência repetitiva, 361-362
sequência única (não repetitiva), 361-362
sequenciamento do, 441-442*f*
superenrolado, 346, 370-371, 372*f*
transcrição do, 346-347
transposição do, 363-364
DNA de fita dupla, 344-345, 355, 378-379. *Ver também* DNA
DNA de sequência única (não repetitiva), 361-362
DNA eucariótico, 422
DNA mitocondrial, 362-363*f*, 362-363*t*
DNA não repetitivo (sequência única), 361-362
DNA recombinante /tecnologia do DNA recombinante
clonagem no, 437-439
DNA-ligase no, 435-436
e hematologia, 675
enzimas de restrição e, 435-436, 435-436*t*
moléculas quiméricas no, 435-437
no estudo de enzimas, 67
tecnologia, 434-443
"DNA saltador," 364
DNA-helicase, 366*f*
DNA-ligase e tecnologia do DNA recombinante, 435-437, 436-437*t*, 437-438*f*
DNA-metilases sítio-específicas, 435-436
DNA-PK. *Ver* Proteinoquinase dependente de DNA
DNA-polimerases, 364-365, 366*f*, 367, 369, 442-443*f*
na tecnologia do DNA recombinante, 436-437*t*
DNA-primase, 366*f*
DNase (desoxirribonuclease)/DNase I, 352
cromatina ativa e, 357
na tecnologia do DNA recombinante, 436-437*t*
DNase ativada por caspase, 708
DNase humana, 736
DNA-topoisomerases, 346, 370-371, 371*f*, 371*t*
dNDPs. *Ver* Difosfatos de desoxirribonucleosídeos
Doadores de prótons, ácidos como, 11
Dobra
formação após desnaturação, 43
posicionamento grupo polar e carregado e, 9-10
proteína, 26*f*, 43-44
Dobra de proteína, 26*f*, 43, 738
chaperonas e, 551, 559-561, 559-560*t*
defeituosa na, 559-560
degradação da, 558-559, 558-559*f*
ubiquitinação na, 560-562, 561-562*f*
Dobra de Rossmann, 39
Dobras de nucleotídeos. *Ver* Dobras de Rossmann
Dobras defeituosas em proteínas
acúmulo no retículo endoplasmático na, 559-560
degradação associada ao retículo endoplasmático da, 558-559*f*, 560-561
ubiquitinação na, 560-561, 561-562*f*

Doença, 1. *Ver também* Histórias de casos bioquímicos; doenças específicas
bases bioquímicas de, 3-4
causas principais de, 3*t*
conformacional, 560-561*t*
genes, rastreamento, 2, 3
Projeto Genoma Humano e, 4-5
Doença arterial coronariana, 543
Doença beta longa, 258-259*t*
Doença cardíaca coronariana (isquêmica). *Ver também* Aterosclerose
colesterol e, 257-258
Doença celíaca, 517
Doença da célula I, 475-476, 477*t*
etiologia da, 586
Doença da urina do xarope de bordo (cetonúria de cadeia ramificada), 293
disfunção do complexo α-cetoácido descarboxilase na, 295*t*
Doença da vaca louca (encefalopatia espongiforme bovina), 44
Doença de Alzheimer, amiloide em, 643*t*, 731, 732*f*
estudo de caso, 730-733, 732*f*
etiologia, 730-731
história e exame físico, 731
tratamento, 731
Doença de Andersen, 181*t*
Doença de células falciformes, 399, 444-445
análise das genealogias, 445-446*f*
Doença de Cori, 181*t*
Doença de Creutzfeldt-Jacob, 44
Doença de deficiência clínica. *Ver também* vitaminas e doenças específicas, 525
Doença de Fabry, 235*t*
Doença de Farber, 235*t*
Doença de Forbes, 181*t*
Doença de Gaucher, 235*t*
Doença de Hartnup, 292, 536
Doença de Hashimoto, 747, 747*t*
Doença de Hers, 181*t*
Doença de imunodeficiência combinada grave, 729-730, 730*f*
Doença de inclusão celular (célula I), 475-476, 477*t*
Doença de Krabbe, 235*t*
Doença de Menkes, 641
deficiência de cobre, 593
Doença de Niemann-Pick, 235*t*
Doença de Pompe, 181*t*
Doença de Refsum, 215, 554, 555*t*
Doença de Refsum infantil, 215, 554, 555*t*
Doença de remoção de remanescente, 258-259*t*
Doença de Tangier, 258-259*t*
Doença de Tarui, 181*t*
Doença de Tay-Sachs, 235*t*
Doença de von Gierke, 181*t*, 339
Doença de von Willebrand, 655
Doença de Wilson, 477*t*, 641
metil-histidina na, 299
mutações de gene na, 477*t*, 640
níveis de ceruloplasmina na, 641
Doença degenerativa ligada ao X, 739-740
Doença do núcleo central, 616
Doença do olho de peixe, 258-259*t*
Doença do vômito da Jamaica, 215
Doença dos cabelos enroscados (doença de Menkes), 641
Doença dos cabelos "enroscados" (doença de Menkes), 641
Doença dos cordeiros gêmeos. *Ver* Toxemia gravídica em ovelhas
Doença granulomatosa crônica, 674
sequência de eventos envolvidos na etiologia de, 674*f*
Doença/síndrome de McArdle, 181*t*
Doenças autoimunes, 543
Doenças conformacionais, 732, 738, 738*f*
Doenças de armazenamento de glicogênio, 132-133, 178-179, 181*t*, 184
Doenças de armazenamento de glicolipídeos, 229-230
Doenças de príons (encefalopatias espongiformes transmissíveis), 44-45
Doenças genéticas. *Ver também* diagnóstico de doenças específicas de
enzimas nas, 67
tecnologia do DNA recombinante nas, 443-444, 445-446*f*
terapia gênica para, 445-446
Doenças metabólicas do metabolismo de aminoácidos, 284*t*
Doenças multifatoriais, bioinformática e, 94
Doenças neurodegenerativas, 732
Doenças neurológicas, alterações na conformação de proteínas e, 44-45
Dolicol, 147, 148*f*, 576
estrutura do, 576
na síntese do colesterol, 525*f*, 253
Dolicolpirofosfato-oligossacarídeo (Dol-P-P--oligossacarídeo), 575-578
Dolicol-P-P-GIcNAc (Dol-P-P-GIcNAc), 576
Dolicol-P-P-oligossacarídeo
estrutura do, 577*f*
via da biossíntese, 576*f*
Domínio de ligação C terminal, 39
Domínio de ligação de ligante, 511
Domínios. *Ver também* tipo específico
albumina, 633-634
cromatina, 356*f*, 357
Ligação do DNA e ativação da transcrição, 429-431*f*
proteína, 39
Domínios circulares, cromatina, 356*f*, 359
Domínios de membrana hidrofóbicos, 44
Domínios regulatórios, 40
Dopa descarboxilase, 301, 304*f*
na biossíntese de catecolaminas, 489
Dopamina. *Ver também* Catecolaminas
biossíntese da, 489, 489*f*
síntese da, 301, 304*f*
Dopamina β-hidroxilase (DBH) na catecolamina biossíntese, 489
Dor, prostaglandinas na, 216-217
Doxiciclina, antibiótico, 733
Drosha-DGCR8 nuclease, 393
dsDNA. *Ver* DNA de fita dupla
DTPA (dietilenetriaminapentacetato), como antioxidante preventivo, 148
Dupla-hélice, da estrutura do DNA, 9-10, 344-345, 345*f*
Dúplexes de RNA-RNA, imperfeitos, 352
Dutos pancreáticos e obstrução, 737

E

E coli, metabolismo da lactose e hipótese do óperon na, 413-416, 413*f*
E_0. *Ver* Potencial redox (oxidação-redução)
Eact. *Ver* Energia de ativação
EcoRI, 435-436, 435-436*t*, 437-438*f*
EcoRII, 435-436*t*
Edema
concentração de proteína plasmática e, 631
na deficiência de tiamina, 525
no *kwashiorkor*, 522
Edematoso. *Ver Kwashiorkor*
Edição do RNA, 393
EDRF. *Ver* Fator de relaxamento derivado do endotélio
EDTA, como antioxidante preventivo, 148
EFA. *Ver* Ácidos graxos essenciais
EFA. *Ver* Ácidos graxos livres
Efeito Bohr, 54
na hemoglobina M, 54
Efeito de Warburg, 713-714
Efeito eletrogênico, 473-474
Efeito hidrofóbico, na bicamada lipídica automontagem, 463
Efeito hipoglicêmico do glucagon, 194
Efetores, 708
Efetores/modificadores alostéricos, 26*f*, 158
na regulação da gliconeogênese, 190-191
negativos, 87. *Ver também* Inibição de retroalimentação,
segundos mensageiros, como, 88-89
Eficiência catalítica, 77
EGF. *Ver* Fator de crescimento epidermal
Eicosanoides, 142, 224-225, 225-226*f*
Elastase, na digestão, 519
Elastina, 593
Elemento de origem da replicação (ORE), 364-365
Elemento de resposta de intensificador, 424*f*
Elementos de controle da transcrição, 388*t*
Elementos de resposta do ferro, 636
Elementos de respostas hormonais
definidos, 510
mapeamento, 427*f*
Sequências de DNA, 500, 501*t*
Elementos do DNA, combinações de, 427*f*
Elementos do DNA, expressão do gene afetada por, 421
Elementos intensificadores, 422
Elementos regulatórios do DNA, 426-427*f*
Eletrófilos, 10-11
Eletroforese
bidimensional, expressão de proteínas e, 33
para-análise de proteínas no plasma, 629
poliacrilamida, para-purificação de proteínas/peptídeos, 28, 28*f*
Eletroforese bidimensional, expressão da proteína e, 33
Eletroforese em gel de, poliacrilamida, para purificação de proteína/peptídeo, 28-29, 28*f*, 29*f*
Eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio
membrana das hemácias, 666-667, 667-668*f*
para purificação de proteínas/peptídeos, 28, 30*f*
Eletroforese em zona de acetato de celulose, 630, 630*f*
Eletrólitos e outros íons, valores de referência para, 726*t*
elFs, na síntese de proteínas, 401
Eliptocitose hereditária, 665-666, 668-669
ELISAs. *Ver* Imunoensaios ligados-enzimas
Elongase, 219, 221*f*
na síntese de ácidos graxos poli-insaturados, 223-224, 223-224*f*

Emagrecimento, 151
Emaranhados neurofibrilares, 733, 733*f*
Emulsões, lipídeos anfipáticos formando, 148, 149*f*
Encefalopatia de Wernicke, 534
Encefalopatia espongiforme bovina, 45
Encefalopatia mitocondrial, acidose lática, e derrame (MELAS), 130
Encefalopatias
  a partir de defeitos mitocondriais hereditários, 122
  de Wernicke, 534
  espongiforme, 44
  hiperbilirrubinemia causando, 318
Encefalopatias espongiformes, transmissíveis (doença dos príons), 44
Encefalopatias espongiformes transmissíveis, 44
Endocitose mediada por receptor, 473-475, 474*f*
Endoglicosidases F, 571-572
Endonucleases, 352, 437-438
  apurínicas e apirimidínicas, no reparo de excisão de bases, 373-375
  restrição, 352, 434-436, 435-436*t*
    na tecnologia do DNA recombinante, 435-436*t*, 436-437, 436-437*t*
Endonucleases de restrição/enzimas, 67, 352, 435-437, 435-436*t*, 436-437
  na tecnologia do DNA recombinante, 435-436, 435-437*t*
Endopeptidases, 519
Endossimbiose, 689
Energia
  ativação, 71
  exigências nutricionais para, 522
  livre. *Ver* Energia livre
  transdução nas membranas, 459
Energia de ativação, 71-73
Energia de ativação, barreira, enzimas que afetam, 73-74
Energia livre
  da hidrólise do ATP, 111, 112*t*
  mudanças na, 110
    acoplamento e, 110, 110*f*
    direção da reação química e, 70-71
    enzimas que afetam, 74-75
    estado de equilíbrio e, 71
    estados de transição e, 71-73
    potencial de redução e, 115, 116*t*
Energia livre Gibbs/energia Gibbs. *Ver* Energia livre
Energia radiante
  Dano ao DNA causado por, 699*t*
  e câncer, 699-700
Enolase, na glicólise, 171, 172*f*
Entactina, 595
Entalpia, 110
Enterócitos, na absorção do ferro, 638
Enteropeptidase, 519
Enterotoxina, 733
Entricitabina, 82
Entropia, 110
Envelhecimento
  como processo programado, 692-696
  e mortalidade, 685
  teoria de mutação somática de, 692
  teorias de uso e abuso (*wear and tear*), de, 685-691
    espécies de oxigênio reativas, 687-689, 687*f*, 688*f*
    glicação proteica, 690, 691, 691*f*
    mitocôndrias, 689-690
    radiação ultravioleta, 690, 690*f*
    radicais livres, 689
    reações hidrolíticas, 685-687, 686*f*
  teorias metabólicas de, 693-694
Envelhecimento, genes
  fatores de transcrição, 695-696
  organismos-modelo para-descoberta, 694-695
Enzima acetil (acil)-malonil, 218*f*, 219
  acetil-CoA, 152, 152*f*, 158
  catabolismo de, 164*f*, 165*f*. *Ver também* Ciclo do ácido cítrico
  lipogênese e, 218-219, 218*f*, 219-220*f*
    como blocos construtores de ácidos graxos, 219
  metabolismo de carboidratos e, 152, 152*f*
  na regulação da lipogênese, 219-221
  na regulação da piruvato-desidrogenase, 175, 176*f*, 222
  na síntese do fator de ativação de plaquetas, 232-233*f*
  Oxidação de ácidos graxos a, 152, 153*f*, 209-210*f*
  oxidação do piruvato a, 167, 168*f*, 174-175, 175*f*, 176*f*, 177*t*
  síntese do colesterol e, 251-253, 251*f*, 253*f*
Enzima de ativação, na ubiquitinação, 560-561
Enzima de clivagem da cadeia lateral do citocromo P450 (P450scc), 483-484
Enzima de conjugação, 560-561
Enzima málica, na produção do NADPH, 218*f*, 219, 219-220*f*
Enzimas, 10-11
  análise no auxílio diagnóstico, 65-67
    infarto do miocárdio, 65
  ativada por metal, 59
  atividade catalítica de, 63. *Ver também* Catálise/reações catalíticas (enzimáticas)
    cinética da, 74-75. *Ver também* Classificação cinética (enzima) de, 58-59
    detecção facilitada por, 63-65
  cinética de, 73-75. *Ver também* Cinética (enzima)
  classificação de, 58-59
  de neutrófilos, 670-671, 670-671*t*
  degradação de, controle de, 87
  desramificação
    ausência de, 181*t*
    na glicogenólise, 178-179*f*, 180
  ensaio de, 64
  especificidade das, 58-59
  isoenzimas e, 63
  isostérica, 88
  mecanismos de ação das, 60
  membranas na localização de, 459
  no desenvolvimento de medicamentos, 82
    especificidade do, 58-59
    regulação do, 86-92, 157*f*
  no diagnóstico/prognóstico de doença, 65
  no reparo do DNA, 373-374, 373-375*t*
  plasma, significado diagnóstico de, 65
  quantidade de, capacidade catalítica afetada por, 86-87
  ramificação, na biossíntese do glicogênio, 178-179, 178-179*f*
  redes de controle e, 91-92
  regulação, 156, 157*t*
  restrição. *Ver* Endonucleases; Enzimas de restrição
  sítios ativos de, 59-60
  substratos que afetam-conformação de, 60
  taxa de hidrólise afetada por, 10-11
  tecnologia do DNA recombinante no estudo de, 67
Enzimas alostéricas, 87-88, 157
  aspartato de transcarbamoilase como modelo de, 88
Enzimas ativadas por metal, 59
Enzimas carboxilase, biotina como coenzima de, 540
Enzimas da borda em escova, 519
Enzimas de metabolização xenobióticas, fatores que afetam, 680-681
Enzimas de processamento de glicoproteínas, 580*t*
Enzimas de restrição. *Ver* Endonucleases de restrição/enzimas
Enzimas desramificadoras
  ausência de, 181*t*
  na glicogenólise, 178-179*f*, 180
Enzimas glicolíticas, no músculo, 608-609
Enzimas isostéricas, 88
Enzimas lisossomais extracelulares, 586
Enzimas lisossomais na doença de célula I, 475-476, 477*t*
Enzimas peroxissomais, 554
Enzimas plasmáticas. *Ver também* Enzimas
  significado diagnóstico das, 65
Enzimas proteolíticas, 65
Enzimas séricas, no diagnóstico clínico, 65*t*
"Enzimas suicidas", ciclo-oxigenase como, 224-226
Enzimologia, molécula única, 63
Enzimologia da molécula simples, 63
Enzimologia diagnóstica, 66
Enzimopatia, 665
Epiderme, 686*t*
Epidermólise bolhosa, 593
Epimerases
  na via da pentose-fosfato, 199*f*, 200
  no metabolismo da galactose, 203, 204*f*
Epímeros, 134-135, 134-135*f*
Epinefrina, 488. *Ver também* Catecolaminas
  biossíntese da, 489, 489*f*
  glicose sanguínea afetada por, 194
  na regulação da gliconeogênese, 190
  na regulação da lipogênese, 221
  síntese de, 301, 304*f*
Epítopo (determinante antigênico), 38
Epóxido hidrolase, 681-682
Epóxidos, 681-682
Eprodisato, 643
Equação de Henderson-Hasselbalch, 13
Equação de Hill, 76-78
Equação de Michaelis-Menten, 76
  concentração de substrato e, 74-78
  reações Bi-Bi e, 81
  regulação do fluxo de metabólitos e, 85, 85*f*
Equações químicas equilibradas, 70-71
Equilíbrio acidobásico, 276-277
Equilíbrio de energia, 522
Equivalentes de redução
  na mitocôndria, 122, 123*f*
  na via da pentose-fosfato, 200
  no ciclo do ácido cítrico, 164-166, 165*f*
Ercalcitriol, 529
Ergocalciferol (vitamina D2), 529
Ergosterol, 147, 147*f*
Eritrócitos
  glicólise nos, 174, 174*f*
  glicose como necessidade metabólica para, 158

hemólise e via da pentose-fosfato/glutationa peroxidase, 200-201, 201*f*
metabolismo dos, 161*t*
"placa viscosa" da hemoglobina S que afetam, 54
via do 2,3-bisfosfatoglicerato nos, 174, 174*f*
Eritropoetina (EPO) humana, 662
Eritropoetina e produção de hemácias, 662
Eritropoetina humana (EPO), 662
Eritropoetina recombinante, 580, 662
Eritropoetina/eritropoetina recombinante (epoetina alfa/EPO), 632*t*
Erlotinibe, 715-716
Erros aleatórios, 721-722
Erros inatos do metabolismo, 2, 281
Erros sistemáticos, 721-722
Escherichia coli, metabolismo da lactose na, hipótese do óperon e, 413-416, 413*f*
Esclerose múltipla, 235
Escorbuto, 265, 269, 525, 593
colágeno afetado no, 45
Esferocitose, hereditária, 477*t*
Esferocitose hereditária, 477*t*, 661*t*, 665-666
causas de, 668-669, 668-669*f*
teste de fragilidade osmótica, 668-669
Esfingofosfolipídeos, 141
Esfingolipídeos, 229-230
metabolismo dos, 233-235, 234-235*f*
aspectos clínicos dos, 234-235, 235*t*
na esclerose múltipla, 235
Esfingolipidoses, 235, 235*t*
Esfingomielinas, 145, 145*f*, 233-234, 234-235*f*, 565-566
assimetria da membrana e, 464
nas membranas, 461, 464
Esfingosina, 145, 145*f*
Espaço intermembrana mitocondrial, proteínas no, 552
Esparteína, 678-679
Espécies reativas de oxigênio, 687-689, 687*f*, 688*f*
como produtos tóxicos para-vida, 687*f*
enzimático e danos de interceptação de mecanismos químicos, 691
quimicamente prolíficas, 687
reações com moléculas biológicas, 688*f*
reações em cadeia e, 687, 689
Especificidade, enzima, 58-59
Especificidade dos testes laboratoriais, 721-722
Espectrina, 667-668*t*, 668-669
Espectro de absorção de porfirinas, 311, 312 *f*
Espectrofotometria
para $NADP^+$ dependente de desidrogenases, 64
para porfirinas, 311-312
Espectrometria, modificações covalentes detectadas por, 31-33, 31*t*, 32*f*
Espectrometria de massa, 31-33, 32*f*
configurações, 32
modificações covalentes detectadas por, 31
peptídeos/proteínas, análise de, 31-32
perfil de transcrito-proteína e, 447, 449
tandem, 32
tandem, detecção de doenças metabólicas, 279-280
Espectrometria de massa em *tandem*, 32
Espectroscopia de ressonância magnética (RM), 40, 43
Espermidina, síntese da, 300, 301*f*
Espermina, síntese da, 300, 301*f*
Espessura, da bicamada, 565-566
Espinha bífida, suplementação de ácido fólico na prevenção da, 538-539
Esqualeno
na síntese do colesterol, 251-252, 252*f*
síntese do, 253*f*
Esqualeno epoxidase, na síntese do colesterol, 252, 253*f*
Esqueleto, 594
Esqueletos, aminoácidos. *Ver* Esqueletos carbônicos de aminoácidos
Esqueletos carbônicos de aminoácidos, catabolismo de, 282-283
cadeia ramificada, 292-293, 294*f*
distúrbios de, 293
formação da acetil-CoA e, 288*f*, 289*f*, 294*f*, 295*f*
formação do piruvato e, 283*f*, 285, 287*f*
iniciação da transaminação de, 282-283, 282-283*f*
Estabilização, dos intermediários não dobrados ou parcialmente dobrados, 559-560
Estado alimentado, combustíveis metabólicos no, 151, 158-160, 160*t*
Estado de jejum, combustíveis metabólicos nos, 151, 160-161, 160*f*, 160*t*
Estado de trava, 622
Estado intermediário na transição tetraédrica, na catálise ácido-base, 61
Estado ligado ao GTP, 565-566
Estado R (relaxado), da hemoglobina, oxigenação e, 52, 53*f*
Estado redox, 210
Estado T (tenso), da hemoglobina
2,3-bisfosfoglicerato estabilizando, 53*f*
oxigenação e, 51
Estado Taut (T), da hemoglobina
2,3-bisfosfoglicerato estabilizando, 53
oxigenação e, 52
Estados de deficiências múltiplas, vitaminas, 525
Estados de transição, 71-73
Estanho, 541*t*
Esteatose hepática, 748
alcoolismos e, 244-246
da gravidez, 215
desequilíbrio no metabolismo do triacilglicerol e, 243-245
doença de esteatose hepática não alcoólica, 243-244
esteatose hepática não alcoólica, 243-244
Estenose aórtica supravalvular, 593
Estequiometria, 70-71
Estereoisômeros, 145, 147*f*. *Ver também* Isomerismo de esteroides
Ésteres de colesterol, 147, 237, 254
no núcleo de lipoproteínas, 239, 239*f*
Esteroespecificidade absoluta de enzimas, 57
Esteroides. *Ver também* tipo específico
afinidade para proteínas de ligação do soro, 496*t*, 146-148, 146*f*, 147*f*
armazenamento dos, 495*t*
estereoisômero dos, 147, 147*f*
síntese dos, 152, 153*f*
suprarrenal. *Ver* Glicocorticoides; Mineralocorticoides
Esteroides gonadais, transporte dos, 496
Esteroidogênese. *Ver* Esteroides
Esteroidogênese ovariana, 485, 487-488, 487-488*f*
Esteroidogênese testicular, 485, 487
Esteróis, 146
Esterol 27-hidroxilase, 256-257, 256-257*f*
Estreptomicina, 136-137
Estreptoquinase, 66, 656
Estresse oxidativo, 698-699
reações nas células sanguíneas, 664*t*
Estria gordurosa, na aterosclerose, 750
Estrogênios
biossíntese dos, 487-488*f*
etapas de hidroxilação dos, 485, 487
por aromatização periférica dos androgênios, 485, 487
no transporte de aminoácidos, 469
Estrona, 485, 487
Estrutura central monoglicosilada, 579
Estrutura da proteína, 732
primária, 26-29. *Ver também* Estrutura primária
quaternária, 36, 39, 39*f*, 40
de hemoglobinas, propriedades alostéricas e, 50-54
fatores de estabilização e, 46
secundária, 36-40
ligações peptídicas afetando, 44
supersecundária, 38
terciária, 36
fatores de estabilização e, 46
Estrutura de tripla-hélice, do colágeno, 45
Estrutura do 2-acetilaminofluoreno, 700*f*
Estrutura do *N*-metil-4-aminoazobenzeno, 700*f*
Estrutura primária, 30, 36. *Ver também* Sequenciamento de proteínas
biologia molecular na determinação da, 30
de polinucleotídeos, 329
genômica na análise da, 33
proteômica e, 33-34
reação de Edman na determinação da, 30, 31
sequência de aminoácidos determinando, 22
técnica de Sanger na determinação da, 29-30
Estrutura quaternária, 36
de hemoglobinas, propriedades alostéricas e, 50-54
fatores de estabilização e, 45
Estrutura secundária, 36-40
ligações de peptídeos afetando, 44
supersecundária, 38
Estrutura terciária, 39*f*
fatores de estabilização e, 40
Estruturas cilíndricas, 559-560
Estruturas do anel de furanose, 133-134, 134-135*f*
Estruturas do anel de piranose, 133-134, 134-135*f*
Estruturas moleculares esquemáticas de CI, 419*f*
Estruturas supersecundárias, 38
Etanol, 742*f*
absorção do ferro e, 522
esteatose e, 244-246
glicosilação da transferrina e abuso crônico de, 635-636
Éteres lipídicos, biossíntese dos, 232-233*f*
Etileno diaminotetra-acetato (EDTA), como antioxidante preventivo, 148
Etiqueta GST (glutationa S-transferase), no estudo de enzimas, 67*f*
Eucromatina, 358
Evolução e expectativa de vida, 695-696
Evolução humana, 4
Excesso de lipoproteína(a), familiar, 258-259*t*
Excreção renal, 743
Exinuclease, no reparo do DNA, 373-374*f*
Exocitose, 473-475, 475*f*-476*f*
Éxons, 360, 395, 443-444
interrupções nos. *Ver* Íntrons (sequências de intervenção)

Exonucleases, 352, 434-435
na tecnologia do DNA recombinante, 436-437*t*
Exopeptidases, 519
Expansões repetidas de trinucleotídeos, 361-362
Expectativa de vida
cálculo, 685
média, 685*t*
Explosão respiratória, 523-524, 673
Exportinas, 552
Expressão do gene constitutiva, 413, 414
Expressão do gene procariótico. *Ver também* Expressão gênica
características especiais da, 413
como modelo para estudo, 413
Expressão gênica
constitutiva, 413
inibição de miRNA e siRNA da, 352
na síntese do nucleotídeo pirimidina, regulação da, 338
regulação da, 412
ácido retinoico na, 527
negativa *versus* positiva, 412-413, 412*t*
respostas temporais e, 412-420, 412*f*
transcrição eucariótica e, 416-420
Expressão gênica eucariótica, 416-420. *Ver também* Expressão gênica
interações DNA-proteínas na, bacteriófago lambda como paradigma para, 416-420, 416*f*
Ezetimiba, para hipercolesterolemia, 258-259

F

FAD. *Ver* Flavina adenina dinucleotídeo
$FADH_2$, oxidação de ácidos graxos produzindo, 209-210*f*
Fadiga (muscular), 170
Fadiga muscular, 170
Fago lambda (λ), 416-420, 416*f*, 417*f*
Fagocitose, 473-474
Fagos, na tecnologia do DNA recombinante, 437-438
Família Alu, 361-362, 364
Família da proteína do plasma de tiol éster, 643
Família de proteínas Rab, 564-565
Família do peptídeo pró-opiomelanocortina (POMC), 494. *Ver também* tipo específico
Família POMC, 494
Farmácia, 1
Farmacogenômica, 4, 681-683, 682-683*f*
Farmacologia, 1
Fármacos anticâncer, que afetam alterações epigenéticas, 715-716*t*
Fármacos anticâncer, que afetam-diferenciação, 715-716*t*
Fármacos anti-inflamatórios não esteroidais, 742, 744
ciclo-oxigenase afetada por, 224-225
síntese de prostaglandinas, 216-217, 224-225
Fármacos de estatinas, 251, 251*f*, 258-259
Fármacos de sulfonilureia, 214-215
Fármacos hipolipidêmicos, 258-259
Fármacos quimioterapêuticos clássicos, 715-716
Fármacos uricosúricos, 744
Fase de relaxamento
da contração do músculo esquelético, 615
da contração do músculo liso
cálcio na, 620
Fase não oxidativa, da via da pentose-fosfato, 200
Fase oxidativa, da via das pentoses-fosfato, 198-200, 198*f*, 199*f*
Fase S do ciclo celular, síntese do DNA durante, 370-374, 372*f*, 372*t*
Faseamento, nucleossomo, 357
Fator anti-hemofílico A/globulina, 652*t*, 653
deficiência de, 655
Fator anti-hemofílico B (fator IX), 652*t*
deficiência de, 655
fármacos cumarínicos que afetam, 655
Fator *Christmas* (fator IX), 651, 651*f*, 652*t*, 653*t*
deficiência de, 655
fármacos culmarínicos que afetam, 655
Fator de aceleração do decaimento, 585
Fator de ativação plaquetário, 229-230
síntese do, 230, 230*f*, 232-233*f*
Fator de célula-tronco, 661
Fator de crescimento derivado de plaquetas, 705
Fator de crescimento endotelial vascular, 711
Fator de crescimento epidermal
Receptor para, 42*f*
Fator de estimulação de colônia de granulócito, 663
Fator de Hageman (fator XII), 651*f*, 652, 652*f*, 652*t*, 653*t*
Fator de relaxamento derivado do endotélio, 622. *Ver também* Óxido nítrico
Fator de Stuart-Prower (fator X), 651*f*, 652*t*, 653*t*
ativação do, 651-652, 651*f*
fármacos cumarínicos que afetam, 655
Fator de transcrição em cabeça de garfo, 42*f*
Fator de transformação beta (TGF- β), 704
Fator de von Willebrand, 655, 657
na ativação plaquetária, 657
Fator estimulador de colônia, 433
Fator I (fibrinogênio), 630*f*, 653, 653*t*
conversão à fibrina, 653-654
Fator II (protrombina), 652, 653*t*
fármacos cumarínicos que afetam, 655
Fator III (fator tissular), 651, 651*f*, 652*t*, 653*t*
Fator induzível por hipóxia 1 (HIF-1), 712
Fator intrínseco, 521, 537
na anemia perniciosa, 537
Fator IV. *Ver* Cálcio
Fator IX (fator anti-hemofílico B/ fator *Christmas*/componente de tromboplastina plasmática), 651*f*, 652, 652*f*, 652*t*, 653*t*
deficiência de, 655
fármacos cumarínicos que afetam, 655
Fator lábil (fator V), 652, 652*f*, 652*t*
Fator lipotrópico, 243-244
Fator sensitivo NEM, 562, 564*t*, 564-565
Fator tecidual (fator III), 651, 651*f*
Fator V de Leiden, 655
Fator V (proacelerina/fator lábil/globulina aceleradora), 652, 652*t*, 653*f*, 653*t*
Fator V de Leiden, 655
Fator VII (proconvertina/acelerador de conversão da protrombina no soro/cotromboplastina), 651, 651*f*, 652*t*, 653*t*
fármacos cumarínicos que afetam, 655
Fator VIII (fator anti-hemofílico A/globulina), 651*f*, 652, 652*t*, 653*t*
deficiência de, 655
Fator X (fator de Stuart-Prower), 651*f*, 652*t*, 653*t*
ativação do, 651-652, 651*f*
fármacos cumarínicos que afetam, 655
Fator X, ativação da protrombina em trombina por, 651*f*, 652, 653
Fator XI (antecedente da tromboplastina plasmática), 651*f*, 652*f*, 652*t*, 653*t*
deficiência de, 655
Fator XII (fator de Hageman), 651*f*, 652, 652*f*, 652*t*, 653*t*
Fator XIII (fator de estabilização da fibrina/fibrinoligase), 651*f*, 652*t*, 653*t*, 654
Fatores associados à TBP, 388
Fatores da coagulação, 652*t*. *Ver também* tipo específico de fator
vitamina K na síntese dos, 532-534
Fatores da transcrição, 388*t*
Fatores de alongamento, na síntese de proteínas, 401, 403-404, 404-405*f*
fator de alongamento 2, 404-405, 404-405*f*
fator de alongamento EF1A, 403-404, 404-405*f*
Fatores de crescimento, polipeptídeos, 705*t*
funções dos, 704
relação com o câncer, 705
Fatores de crescimento hematopoiético, 663
Fatores de estimulação de colônias de granulócitos-macrófagos, 663
Fatores de inibição do crescimento, 704
Fatores de liberação
RF1/RF3, na terminação da síntese de proteínas, 405-406, 405-406*f*
Fatores de risco modificáveis, câncer, 705
Fatores de troca do nucleotídeo guanina, 552, 553*f*
Favismo, 204
Fe. *Ver* Ferro
Feixe de quatro hélices, 564-565
Fenilalanina, 19*t*
catabolismo da, 288, 289*f*, 290
na fenilcetonúria, 288, 289*f*
na síntese de tirosina, 269, 269*f*
necessidades para, 524
Fenilalanina hidroxilase, 42*f*, 284*t*
defeito na, 288
na síntese de tirosina, 269, 269*f*
Fenilcetonúria, 288
Feniletanolamina-N-metiltransferase (PNMT) na biossíntese de catecolaminas, 489
Fenilisotiocianato (reagente de Edman), no sequenciamento de proteínas, 29, 30*f*
Fenobarbital, 678-679
Fenótipo SADDAN, 605-606
Ferramenta Local Básica de Busca do Alinhamento. *Ver* BLAST
Ferrirredutase, 634-635*f*
Ferritina, 521, 638, 744, 745
síntese de proteínas afetadas por, 408
valores de referência para, 726*t*
Ferro, 530*t*
absorção do, 521, 633-634, 633-634*f*, 745
na hemocromatose, 521
vitamina C e etanol afetando o, 521
ferroso, no transporte de oxigênio, 48-50
heme, 314, 633-634
absorção de, 307, 521
ambiente prejudicado para, 49-50
na meta-hemoglobinemia, 54
incorporação na protoporfirina, 309, 309*f*
metabolismo do, 633-634, 633-634*f*
não heme, 634-635
transferrina no transporte do, 633-634
Ferro do heme, 314
absorção do, 522, 633-634*f*, 634-635
ambiente prejudicado para, 49-50
Ferro férrico, 314
na meta-hemoglobinemia, 54
Ferro ferroso
incorporação do, na protoporfirina, 309
no transporte de oxigênio, 48-50
Ferro não heme, 634-635

Ferro total do corpo, 745
Ferroportina, 521, 634-635
Ferroquelatase (heme-sintase), 309, 313*t*, 314
  na porfiria, 313*t*
Fertilização, 582
Fe-S Rieske, 124
FGFR3 (receptor do fator de crescimento do fibroblasto 3), 605-606
Fibras musculares, tipos de, 625*t*
Fibrina
  depósitos, 650
  dissolução pela plasmina, 655-656, 656*f*
  fibrilina-1, 594
  fibrilina-2, 594
  formação da, 651*f*, 653
    trombina na, 653-654
  formação de rede de, 650
  no trombo, 650
Fibrinogênio (fator I), 630*f*, 653, 653*t*
  conversão para fibrina, 653-654
Fibrinoligase (fator XIII), 651*f*, 652*t*, 653*t*, 654
Fibrinólise, 659*t*
Fibrinopeptídeos-e B, 654*f*
Fibroblastos, 577
Fibronectina, 592, 594
  interação celular
    representação esquemática da, 595*f*
  representação esquemática da, 594*f*
Fibrose cística, 477, 477*t*, 478-479, 478-479*t*, 517, 587
  estudo de caso, 736-738, 738*t*
Fígado
  biópsia, 744
  captação de bilirrubinas pelo, 315-317, 316*f*
  captação de glicose para, 158
  cirrose do, 163, 244-245, 741
  corpos cetônicos produzidos pelo, 210, 211-212*f*, 212-213
  esteatose
    alcoolismo e, 244-245
    da gravidez, 215
    desequilíbrio do metabolismo do triacilglicerol e, 243-245
  fosforilase no, controle da, 180
  frutose-2,6-bisfosfato na regulação do, 191, 191*f*
    glicogênio, 178-179*f*
    lipídeos, 243-244, 244-245*f*
  glicogênio no, 178-179, 178-179*t*
  glicogenólise no, 180
  metabolismo da vitamina D no, 529
  metabolismo no, 152, 154*f*, 155*f*, 161*t*, 163
    frutose, 201, 203*f*
    glicose, 188*f*, 191, 192*f*
    oxidação e cetogênese dos ácidos graxos, 211-212, 211-213*f*
  no estado de jejum, 160
  síntese da vitamina D_3 no, 531-532*f*
  síntese de proteínas plasmáticas no, 155, 631
  síntese do heme no, 309
    ALA-sintase na regulação do, 309-311, 312*f*
  sobrecarga de frutose e, 204-205
  Testes de função hepática, valores de referência para, 727*t*
Figlu. *Ver* Formiminoglutamato
Filamentos de miosina (espessos), 610
Filamentos finos (actina), 609, 610
Filamentos grossos (miosina), 609, 610
Filoquinona, 530*t*. *Ver também* Vitamina K
Filtração em gel, para purificação de proteína/peptídeo, 28*f*
Filtração glomerular, 595
Filtro de seletividade, 471
FISH. *Ver* Hibridização *in situ* fluorescente
Fisiologia, 1
Fita atrasada (retrógrada), na replicação do DNA, 366, 366*f*, 369*f*
Fita codificadora, 344, 380*f*
  na síntese do RNA, 377-378
Fita líder (para frente), na replicação do DNA, 366, 366*f*, 369*f*
Fita não codificadora, 344
Fita simples de DNA. *Ver também* Replicação de DNA-partir da, 364-365
Fita-molde de DNA, 344, 348, 348*f*
  transcrição da, na síntese do RNA, 378-379
Fitas antiparalelas, DNA, 344, 345*f*
Fitase, 521
Fixação, 562, 564-565
Flavina adenina dinucleotídeo, 116, 328*t*, 535
  no ciclo do ácido cítrico, 166
Flavoproteínas
  como oxidases, 116-117, 119*f*
  nos complexos da cadeia respiratória, 117, 122
  transferência de elétrons, 117
Flavoproteínas de transporte de elétrons, 117, 209-210
Flebotomia, 744, 745
Flip-flop, fosfolipídeos, assimetria da membrana e, 464
Fluidez, membrana, 465-466
Flúor, 541*t*
  na glicólise, 172*f*
1-Flúor-2,4-dinitrobenzeno (reagente de Sanger), para o sequenciamento de polipeptídeos, 29
Fluoracetato, 165*f*
Fluorescência, de porfirinas, 311-312, 312*f*
5-Fluoruacil, 328*f*
Fluvastatina, 258-259
Fluxo de elétrons, por meio da cadeia respiratória, 123, 123*f*
"Fluxo de massa", das proteínas de membrana, 564-565
Fluxo de metabólitos, 85
FMN. *Ver* Mononucleotídeo de flavina
Focalização isoelétrica, 29, 29*f*
Folato. *Ver* Ácido fólico
Folha β, 38
  de Aβ42, 732
Folha β antiparalela, 38, 38*f*
Folha β paralela, 38
Folhas de mielina, 473-474
Footprinting, DNA, 451-452
Força motriz de prótons, 125
Forças de Starling, 631
Forças de Van der Waals, 9-10
Forças não covalentes
  conformação de peptídeos e, 23
  na estabilização biomolecular, 8-9
Formação de dímeros de timina e luz UV, 690, 690*f*
Formação de estado de transição intermediário durante-reação química simples, 72-73*f*
  tetraédrica, na catálise acidobásica, 61
Formas congênitas da distrofia muscular, 616
Formil-tetra-hidrofolato, 538-539
Formiminoglutamato, 283, 286*f*
Forquilha de replicação, 370-371*f*
Fosfágenos, 113
Fosfatase ácida, significância diagnóstica de, 65
Fosfatase alcalina, 602-604
  isoenzimas de, significado diagnóstico de, 65*t*
  na tecnologia do DNA recombinante, 436-437*t*
  para valores de referência, 727*t*
Fosfatases
  ácida, significado diagnóstico da, 65*t*
  alcalina
    isozimas da, significado diagnóstico das, 65*t*
    na tecnologia do DNA recombinante, 436-437*t*
Fosfatidato, 230, 230*f*
  na síntese do triacilglicerol, 230, 231*f*
Fosfatidato fosfohidrolase, 230, 231*f*
Fosfatidilcolina, 678-679
  metabolismo da, 233-234*f*
Fosfatidilcolinas (lecitinas), 144, 144*f*
  assimetria da membrana e, 464
  síntese das, 230, 230*f*
Fosfatidiletanolamina (cefalina), 144*f*, 145
  assimetria da membrana e, 464
  síntese da, 230, 231*f*
Fosfatidilglicerol, 144*f*, 145
Fosfatidilinositóis, 481-482*t*
Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2), 145, 463
  na ativação plaquetária, 657, 658*f*
Fosfatidilinositol bisfosfato, hidrólise do, 673
Fosfatidilinositol/fosfatidilinositídeo, 144*f*, 145
  como segundo mensageiro/precursor de segundo mensageiro, 144*f*, 145
  síntese do, 230, 230*f*
Fosfatidilserina, 144*f*, 145
  assimetria da membrana e, 464
Fosfato de di-hidroxiacetona, na glicólise, 230, 231*f*
Fosfatos de alta energia, 111. *Ver também* ATP
  como "moeda energética" da célula, 112, 127
  na captura e transferência de energia, 111, 112*t*
  símbolo designando, 112
Fosfatos de baixa energia, 111
Fosfatos/fósforo, 536
  alta energia, 111. *Ver também* ATP
    como "moeda de troca energética" da célula, 112, 127
    designação simbólica, 112
    na captura e transferência de energia, 111-112, 112*t*
  baixa energia, 111
  energia livre da hidrólise do, 111-112, 112*t*
  no líquido extracelular e intracelular, 460*t*
Fosfocreatina,no músculo, 608-609
Fosfodiesterases, 329, 504
  AMPc hidrolisado por, 181
Fosfoenolpiruvato
  energia livre da hidrólise do, 112*t*
  na gliconeogênese, 166, 167*f*
Fosfoenolpiruvato carboxiquinase, 166, 167*f*
  na regulação da gliconeogênese, 166, 167*f*, 188, 188*f*
Fosfoenolpiruvato-carboxilase, 190*t*
  na gliconeogênese, 190*t*
Fosfofrutoquinase (fosfofrutoquinase-1), 190*t*
  músculo, deficiência de, 176, 181*t*
  na glicólise, 171, 172*f*, 190*t*
    regulação e, 174
  na regulação da gliconeogênese, 191
3-Fosfoglicerato
  na glicólise, 172*f*, 174
  na síntese da serina, 267, 268*f*

Fosfoglicerato mutase, na glicólise, 171, 172*f*
Fosfogliceratoquinase, na glicólise, 171, 172*f*
nos eritrócitos, 174, 174*f*
Fosfoglicerídeos, nas membranas, 460-461, 461*f*
Fosfogliceróis
lisofosfolipídeos no metabolismo dos, 144, 145*f*
síntese dos, 230, 230*f*
Fosfoglicomutase, na biossíntese do glicogênio, 178-179*f*, 201-202*f*
6-Fosfogliconato desidrogenase, 198*f*, 199, 199*f*
Fosfohexose-isomerase, na glicólise, 171, 172*f*
Fosfolipase A_1, 233-234, 233-234*f*
Fosfolipase A_2, 232-233*f*, 233-234, 233-234*f*
na ativação plaquetária, 657, 658*f*
Fosfolipase C (PLC), 233-234, 233-234*f*
ativação e interações de receptores hormonais e, 506*f*
clivagem pelo PIP_2, 506*f*
Fosfolipases
fosfolipase D, 233-234, 233-234*f*
na degradação e no remodelamento do fosfoglicerol, 232-234, 233-234*f*
Fosfolipídeos, 141, 237
como precursores e mensageiros secundários, 229-230
digestão e absorção dos, 518-519
glicerol éter, síntese do, 230-233, 232-233*f*
na atividade da lipoproteína lipase, 240, 242
na esclerose múltipla, 235
nas membranas, 144-145, 145*f*, 460-461, 461*f*, 463, 565-566
assimetria da membrana e, 565-566
síntese dos, 231*f*
Fosfolipídeos de éter de glicerol, síntese dos, 230-233, 232-233*f*
Fosfoproteínas acídicas, 602-604
Fosfoproteínas fosfatases, 504
Fosforilação, proteína
múltiplos sítios, no metabolismo do glicogênio, 184
na modificação covalente, 89, 90*f*, 91*t*
aumentos de massas e, 31*t*
no nível de substrato, 126*f*, 127
oxidativa. *Ver* Fosforilação oxidativa
versatilidade da, 91, 91*t*, 92*f*
Fosforilação de proteínas. *Ver* Fosforilação, proteína
Fosforilação em múltiplos sítios, no metabolismo do glicogênio, 184
Fosforilação oxidativa, 113, 122, 152, 623, respiração e, por meio do ATP. *Ver também* Fosforilação, proteína; Cadeia respiratória
enzimas como marcadoras de compartimentos separados por membranas mitocondriais na, 122
geração de ATP por, 125
no nível da cadeia respiratória, 125, 177*t*
Fosforilase
AMPc e, 183*f*
ativação da, AMPc e, 182
cálcio/contração muscular e, 182
fígado, 180
deficiência de, 181*t*
fosforilase a, 182, 183*f*
fosforilase b, 182, 183*f*
músculo, 180
ausência de, 181*t*
no metabolismo do glicogênio, 178-179*f*, 182
regulação da, 182, 184*f*
Fosforilase muscular
ausência de, 181*t*
fase de relaxamento da
AMPc e, 183*f*
contração cálcio/músculo e, 182
Fosforilase-quinase
cálcio/sensível à calmodulina, na glicogenólise, 182
deficiência de, 181*t*
fosforilase-quinase a, 182, 183*f*
fosforilase-quinase b, 182, 183*f*
proteína fosfatase 1 afetando, 182
Fósforo. *Ver* Fosfatos/fósforo
Fosfotriose isomerase, 171
Fotosensibilidade, na porfiria, 313
Fototerapia, câncer, porfirinas na, 311
Fototerapia do câncer, porfirinas na, 311
FPA/FPB. *Ver* Fibrinopeptídeos-e B
Fração de glicerol, dos triacilgliceróis, 152
Frações, 27*f*
Fragmento cristalizável (Fc), 646
Fragmentos de Okazaki, 366, 367, 369*t*, 369*f*
D-Frutofuranose, 134-135*f*
D-Frutopiranose, 134-135*f*
Frutoquinase, 201, 203*f*
deficiência de, 204-205
Frutose
absorção da, 518, 518*f*
absorção de ferro afetada por, 521
formas de piranose e furanose, 134-135*f*
hepática
hipertriacilglicerolemia/hipercolesterolemia/hiperuricemia e, 204
metabolismo afetado por, 201-206, 203*f*
índice glicêmico da, 518
metabolismo da, 203*f*
defeitos no, 204-206
na catarata do diabetes, 205-206
D-Frutose, 135*t*
Frutose 1,6-bisfosfatase, 200
Frutose 2,6-bisfosfatase, 191, 191*f*
na catálise covalente, 62
Frutose 6-fosfato
energia livre da hidrólise da, 112*t*
na glicólise, 171, 172*f*
na gliconeogênese, 188*f*, 198
Frutose hepática
hipertriacilglicerolemia/hipercolesterolemia/hiperuricemia e, 204
metabolismo afetado pela, 201-206, 203*f*
Frutose-1,6-bisfosfato
na glicólise, 171, 172*f*
na gliconeogênese, 188*f*, 198
Frutose-2,6-bisfosfato, 191, 191*f*
Frutosúria, essencial, 197, 204-205
Frutosúria essencial, 197, 204-205
Fucosil (Fuc)-transferase, 669-670
Fumarase, 165*f*, 166
Fumarato, 165*f*, 166
na síntese da ureia, 276-278
no catabolismo da tirosina, 289*f*
Fumarato de disoproxil tenofovir, 82
Fumarato hidratase. *Ver* Fumarase
Fumarilacetoacetato, no catabolismo da tirosina, 287, 289*f*
Fumarilacetoacetato hidrolase, 284*t*
defeito na tirosinemia, 287
Fumo na metionina, 642
Função cognitiva, declínio da, 731
Funções sinápticas, 732
Furina, 566-567
Fusão celular, 648, 756
Fusão de membrana, 562, 564
Fusão de vesículas, 562, 564
FXR. *Ver* Receptor Farnesoide X

G

G6PD (glicose-6-fosfato desidrogenase), 664*t*, 665
deficiência, 661*t*
e anemia hemolítica, 665, 665*f*
G-actina, 610
GAGs. *Ver* Glicosaminoglicanos
Gal transferase, 670-671
Galactoquinase, 201-202, 204*f*
defeitos hereditários na, 204-205
Galactosamina, 203
D-Galactosamina (condrosamina), 136-137
Galactose, 132-133
absorção de, 518, 518*f*
D-Galactose, 134-135*f*, 135*t*
índice glicêmico da, 518
metabolismo da, 201-203, 204*f*
deficiências de enzimas E, 205-206
Galactose-1-fosfato-uridil-transferase, 201-202, 204*f*
Galactosemia, 132-133, 197, 205-206
Galactosida, 135
Galactosidases, 571-572
Galactosilceramida, 146, 146*f*, 233-234, 235*t*
Galato de propila, como preservativo antioxidante/alimento, 148
GalCer. *Ver* Galactosilceramida
GalNAc transferase, 670-671
GalNAc-Ser(Thr), 572-573
Gangliosídeo GM, 733
Gangliosídeo GM, 146, 146*f*, 733
Gangliosídeo GM_3, 146
Gangliosídeos, 146
ácidos siálicos nos, 136-137
aminoaçúcares nos, 136-137, 204-205*f*
síntese dos, 234-235, 234-235*f*
Gasto de energia, 522
Gastrenteropatia, perda de proteínas, 632
Gastrenteropatia perdedora de proteínas, 632
G-CSF. *Ver* Fator de estimulação de colônia de granulócitos-macrófagos
GDH. *Ver* Glutamato desidrogenase/L-Glutamato desidrogenase
GDP, 556
GDP. *Ver* Guanosina difosfato
Gefinibe, 715-716
GEFs. *Ver* Fatores de troca de nucleotídeo guanina
Gene. *Ver* Genes; Genoma
Gene A, 670-671
Gene *B*, 670-671
Gene codificador de mRNA, 442-443
Gene *Cro*, 417, 417*f*, 418*f*
Gene Entrez, 98-99
Gene estimulador do β-interferon humano, 426-427*f*
Gene HFE, 745
Gene induzível, 413
Gene *lacA*, 413*f*, 414, 414*f*
Gene *lacI*, 414, 414*f*
Gene *lacY*, 413*f*, 414
Gene *lacZ*, 413*f*, 414
Gene *O*, 670-671
Gene *P53*, 709

Gene POMC, 494
Genes
alteração dos, 362-365, 364*t*
amplificação dos, na regulação da expressão gênica, 373-374*f*
constitutivos (*housekeeping*), 413
desconhecido previamente, 4
imunoglobulina, rearranjo do DNA e, 364-365
reparo da quebra da fita dupla e, 375
induzível, 413
interrupção do alvo de, 447, 449
knockout, 447, 449
processado, 364
Genes antiapoptóticos, superexpressão de, 709
Genes codificadores, 592
Genes constitutivos (*housekeeping*), 413
Genes de imunoglobulinas, 647
rearranjo do DNA e, 364-365
reparo da quebra da fita dupla e, 373-374*f*
Genes de proteínas *s36* e *s38,* córion, 432-433*f*
Genes humanos, localização dos, 443-444*t*
Genes *knockout*, 447, 449
Genes nucleares, proteínas codificadas por, 550
Genes supressores do tumor
e oncogenes, diferenças entre, 703*t*
funções dos, 702, 703
papel no desenvolvimento do câncer colorretal, 703, 704, 704*f*
propriedades dos, 703*t*
Genes supressores do tumor, p53, 373-375
Genética, 1
Genética reversa, 737
Genéticas moleculares, 1, 434-440. *Ver também* DNA recombinante/tecnologia do DNA recombinante
Genfibrosila, 258-259
Genoma
e medicamentos, em bioinformática, 95-96
redundância no, 360-362
remoção do gene do (interrupção/*knockout* do gene no alvo), 447, 449
Genoma mitocondrial, 550
Genômica, 94
habilita proteínas, 33
sequenciamento de proteínas e, 30
Geração do sinalizador, 500-501
Geranil difosfato, na síntese do colesterol, 251, 252*f*
Geranilgeranil, no revestimento vesicular, 565-566
GGT. *Ver* γ-Glutamiltransferase
Glândulas exócrinas, 736, 737
GlcCer. *Ver* Glicosilceramida
GlcNAc fosfotransferase, 586
GlcNAc transferase V, 712
Glibenclamida. *Ver* Gliburida
Gliburida, 214-215
Glicação avançada, produtos finais, 581, 690
formação de, 581, 582*f*
Glicano (glicosano), 136-137
Glicano transferase, na glicogenólise, 178-179*f*, 180
Gliceraldeído (glicerose), D e L
isômeros de, 133-134*f*
Gliceraldeído-3-fosfato
na glicólise, 171, 172*f*
oxidação do, 171, 173*f*
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
na glicólise, 171, 172*f*
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 667-668*t*
Glicerofosfolipídeos, 141
Glicerol, 144
coeficiente de permeabilidade, 463*f*
síntese do, 189
Glicerol-3-fosfato
biossíntese do acilglicerol e, 230, 231*f*
energia livre da hidrólise do, 112*t*
esterificação do triacilglicerol e, 246-247, 246*f*
por meio da transferência de elétrons, 123
Glicerol-3-fosfato aciltransferase, 230, 231*f*
Glicerol-3-fosfato desidrogenase, 230, 231*f*
Glicerol-3-fosfato e desidrogenase mitocondrial, 117
Glicerol-quinase, 229-230, 231*f*, 246
Glicerose (gliceraldeído), isômeros D e L de, 133-134*f*
Glicina, 21, 299
catabolismo da, formação do piruvato e, 285, 286*f*
na síntese do heme, 299, 308-311, 310*f*, 312*f*
síntese da, 267-268, 268*f*
Glicina *N*-metil-transferase, 284*t*
Glicinúria, 285
Glicobiologia, 568-569
Glicocálice, 139
Glicoconjugados, 568-569
glicanos de, 587-588
pesquisa em, 588
Glicocorticoides, 509. *Ver também* tipo específico
glicose sanguínea afetada por, 194
na lipólise, 246-247, 247-248*f*
regulação da expressão gênica por, 500*f*
síntese dos, 484-485, 484-485*f*
transportado por globulina ligadora de corticosteroide, 496
Glicoesfingolipídeos, 141, 145-146, 146*f*, 233-235, 234-235*f*, 565-566, 669-670
Glicoforinas, 139, 572-573
glicoforinas A, B, e C, 667-668, 667-668*t*
Glicoformas, 569-570
D-Glicofuranose, 134-135*f*
Glicogênese, 153, 178-179, 178-179*f*
regulação da
AMP cíclico na, 182, 183*f*, 184, 184*f*
enzimas na, 190*t*
glicogênio sintase e fosforilase na, 182, 184*f*
Glicogenina, 178-179, 178-179*f*
Glicogênio, 137, 138*f*
AMP cíclico no, 183*f*, 184*f*
armazenamento de carboidratos e, 178-179, 178-179*t*
glicogênio sintase e fosforilase no, 182, 184*f*
metabolismo do. *Ver também* Glicogenêse; Glicogenólise
aspectos clínicos do, 181*t*, 184
ramificação do, 178-179*f*
músculo, 158, 178-179, 178-179*t*
no metabolismo de carboidratos, 152, 153*f*, 189
papel do AMP cíclico na regulação do metabolismo do,182-184, 183*f*
ramificação do, 180
síntese do, 160
Glicogênio fosforilase, 178-179*f*, 180-182, 623, 624
piridoxal fosfato como cofator para, 536
regulação da, 182, 184, 184*f*
Glicogênio sintase, no metabolismo do glicogênio, 178-179, 178-179*f*, 190*t*, 198
glicogênio sintase a, 182, 184*f*
glicogênio sintase b, 182, 184*f*
regulação da, 182-183, 184*f*
Glicogenólise, 154
AMP cíclico na regulação da, 183, 183*f*, 184*f*
desramificação de enzimas na, 178-179*f*, 180
glicogênio sintase e fosforilase na regulação da, 183, 184*f*
independente do AMP cíclico, 182
regulação da glicose sanguínea e, 192-194, 192*f*, 193*f*
via da, 178-179, 178-179*f*
Glicolipídeos, 141, 145-146, 146*f*, 568-569
aminoaçúcares nos, 203, 204-205*f*
galactose na síntese dos, 201-203, 204*f*
Glicólise, 113, 152, 153*f*, 171-176, 172*f*
aeróbio, 171
anaeróbio, 170, 171, 172*f*
aspectos clínicos da, 176
ATP gerado por, 176, 177*t*
barreiras termodinâmicas para reversão da, 187-190
no nível subcelular, 156, 156*f*
nos eritrócitos, 174, 174*f*
oxidação do piruvato e, 166, 168*f*, 174-176, 175*f*, 176*f*, 177*t*
regulação da, 174
enzimas na, 190*t*
frutose 2,6-bisfosfato na, 191, 191*f*
gliconeogênese e, 174-176, 189-192, 190*t*, 191*f*
utilização da glicose/gliconeogênese e, 171-174, 172*f*, 174*f*, 187-189, 188*f*. *Ver também* Gliconeogênese
vias da, 171-173, 172f, 173f
Glicólise aeróbia, 174
como fonte de ATP no músculo, 624-625
taxa em células cancerosas, 713-714
Glicólise anaeróbia, 170, 172*f*, 624-625, 750
como fonte de ATP muscular, 624, 625
Glicoma, 568-569
Glicômicos, 4
Gliconeogênese, 152, 153, 187-196, 188*f*, 741, 742*f*
ciclo do ácido cítrico na, 166-167, 167*f*, 187-189, 188*f*
custo de energia da, 195
na glicólise, 171-173, 172*f*, 174*f*, 188*f*, 189
regulação da, 174-176
regulação da, 189-192, 190*t*, 191*f*
barreiras termodinâmicas para glicólise e, 187-189, 188*f*
ciclos de substrato (fúteis) na, 191-192
frutose 2,6-bisfosfato na, 191, 191*f*
indução/repressão de enzimas na, 190, 190*t*
modificação alostérica na, 190-191
modificação covalente na, 190
regulação da glicose sanguínea e, 192-194, 192*f*, 193*f*
Gliconolactona hidrolase, 199, 199*f*
D-Glicopiranose, 134-135*f*
Glicoproteína glicosiltransferases, 574-575
Glicoproteína IIb-IIIa, na ativação plaquetária, 657, 658*f*
Glicoproteína lisossomal hidrolases
deficiências genéticas de, 586-587
Glicoproteínas, 36, 136-137, 136-137*t*, 204-205*f*, 482-483*f*, 568-588, 570-571*t*, 575, 631. *Ver também* Proteínas plasmáticas; tipo específicos
açúcares de nucleotídeos, 574-575
açúcares nas, 574-575

aminoaçúcares nas, 136-137, 203, 204-205*f*
ancorado ao glicosilfosfatidilinositol, 572-573
anormalidades na biossíntese das, 584*t*
assimetria da membrana e, 464
cadeias de oligossacarídeos das, 569-570*t*, 574-575
carboidratos nas, 135*t*
classes das, 572-573
complexo, 577
doenças associadas-anormalidades das, 584-585
espectroscopia de ressonância magnética (RM), 569-570
estrutura e função das, 571-572*t*
extracelular, pinocitose absortiva das, 475
funções das, 568-570, 569-570*t*
galactose na síntese das, 203, 204*f*
glicoproteínas humanas, 570-571*t*
híbridas, 575
imunoglobulinas como, 646
ligação, natureza anidro das, 571-572
ligação *N*, 572-573
ligado ao *O*, 574-575
manose elevada, 575
na fertilização, 582
na zona pelúcida, 582
receptor de asialoglicoproteínas na depuração das, 571-572
como substâncias de grupos sanguíneos, 568-569
técnicas para estudo das, 569-571
glicosidases nas, 571-572
lecitinas nas, 572-573
receptor de asialoglicoproteínas, 571-572
Glicoproteínas ligadas ao *N*, 574-575
Glicoquinase, 190*t*
na biossíntese do glicogênio, 178-179, 178-179*f*, 190*t*
na glicólise, 171, 172*f*, 190*t*
na regulação da glicose sanguínea, 193, 193*f*
Glicosamina (GlcN), 598
Glicosamina, 136-137*f*, 203, 204-205*f*
Glicosaminoglicanos, 136-137, 138*f*, 595-602, 596. *Ver também* tipos específicos
aminoaçúcares nos, 136-137
estruturas dos, 597*f*
funções dos, 601-602*t*
propriedades dos, 598*t*
Glicosano (glicano), 136-137
Glicose, 132-138, 624, 741
absorção da, 517-524, 518
captação de, 158
coeficiente de permeabilidade da, 463*f*
como necessidade metabólica, 158
como precursor de aminoaçúcar, 203, 204-205*f*
conversão para galactose, 201-202, 204*f*
epímeros de, 139, 139*f*
estrutura da, 133-134, 134-135*f*
formas de furanose, 133-134, 134-135*f*
formas de piranose, 133-134, 134-135*f*
índice glicêmico da, 518
interconvertibilidade da, 158
isômeros de, 134-135, 134-135*f*
limiar renal para, 194
na biossíntese do glicogênio, 178-179, 178-179*f*
no líquido extracelular e intracelular, 460, 460*t*
secreção de insulina e, 192-194
transporte de, 192, 193*f*, 473-474, 473-474*f*, 518
insulina afetando, 473-474
valores de referência para, 726*t*
Glicose, sangue
ácidos graxos livres e, 246-247
ATP gerado por, 176, 177*t*
hemácias e, 663
inanição e, 160, 160*f*, 160*t*
insulina afetando, 192-194
no estado alimentado, 158, 160
normal, 178-179
pela via da pentose-fosfato, 152, 197, 198*f*, 199*f*, 201*f*
regulação da
aspectos clínicos da, 194-195, 195*f*
dieta/gliconeogênese/glicogenólise na, 192-195, 192*f*, 193*f*
glicogênio na, 180
glicoquinase na, 193, 193*f*
glucagon na, 194
insulina na, 192-194
limites de, 192
mecanismos metabólicos e hormonais na, 193, 193*t*
D-Glicose, 133-135*f*, 135*t*
L-Glicose, 133-134*f*
Glicose permeasse, 663, 664*t*
Glicose sanguínea. *Ver* Glicose, sangue
Glicose-1-fosfato
energia livre da hidrólise de, 112*t*
na gliconeogênese, 188*f*, 189
Glicose-6-fosfatase
deficiência de, 181*t*, 339
na glicogenólise, 180
na gliconeogênese, 190*t*
Glicose-6-fosfato, 180
energia livre da hidrólise de, 112*t*
na biossíntese do glicogênio, 178-179, 178-179*f*
na glicólise, 171, 172*f*
na gliconeogênese, 185, 188*f*
Glicose-6-fosfato desidrogenase
deficiência de, 197, 203-204
na via da pentose-fosfato, 197, 198*f*, 199*f*
Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), 664*t*, 665
deficiência de, 661*t*
e anemia hemolítica, 665, 665*f*
Glicosidases, 571-572
Glicosídeo, 135
Glicosídeos, 135
Glicosídeos cardíacos, 136-137
N-glicosídeos, heterocíclicos, 324
Glicosilação, 581
cotraducional, 557
distúrbios congênitos da, 585*t*, 635-636
na modificação covalente, aumentos de massa e, 31*t*
Glicosilação cotraducional, 557
Glicosilação *O*
características da, 574-575*t*
N-glicosilação de glicoproteínas, 581
N-glicosilases, no reparo de excisão de base, 373-374*f*
Glicosilceramida, 146, 233-234, 234-235*f*
Glicosilfosfatidilinositol, 564-565, 573
Glicosúria, 194, 739-740
Glicosúria hiperglicêmica, 724-725*t*
Glicosúria renal, 724-725*t*
D-Glicuronato, 134-135, 135*f*
Glicuronato/ácido glicurônico, 201, 201-202*f*
conjugação da bilirrubina com, 316, 316*f*
Glicuronidação
da bilirrubina, 316, 316*f*
Glicuronidação da bilirrubina, 679-680
Glicuronídeos, 197, 201
Glipiação, 581
Globina, 314
β-Globina, agrupamento de genes, representação esquemática de, 444-445*f*
Globulina aceleradora (fator V), 652*t*
Globulina de ligação da tireoide, 632*t*
Globulina de ligação de corticosteroide, 496, 632*t*
Globulina de ligação de hormônio sexual (SHBG), 496
testosterona e globulina de ligação do estrogênio, 632*t*
Globulina de ligação de tireoxina, 495
Globulinas, 630
Glomérulo renal, 595
Glomerulonefrite, 595
Glucagon, 152, 181, 194
na regulação da gliconeogênese, 190
na regulação da lipogênese, 221, 221*f*
no estado de jejum, 160
GLUT 1-4. *Ver* Transportadores de glicose
GLUT1 (transportador de glicose), 663, 664*t*
Glutamato
carboxilação do, vitamina K como cofator para, 533
catabolismo do, 282-283*f*, 283
na biossíntese da ureia, 273-274*f*, 274-275, 274-275*f*
na síntese da prolina, 268, 268*f*
síntese do, 267, 267*f*
transaminação e, 273-274*f*, 274-275, 274-275*f*
Glutamato aminotransferase, 274-275
L-Glutamato descarboxilase, 304, 305*f*
Glutamato desidrogenase/L-glutamato desidrogenase, 267, 267*f*
no metabolismo do nitrogênio, 274-277, 275-276*f*
Glutamato γ-semialdeído, 268*f*
Glutamil amidotransferase, PRPP, regulação da, 334, 335, 335*f*
γ-Glutamil fosfato, 267
γ-Glutamiltransferase (γGT/GGT), valores de referência para, 727*t*
γ-Glutamiltransferase, 680-681
Glutamina, 19*t*, 273-274
catabolismo de, 283, 283*f*
no catabolismo de aminoácido nitrogenado, 275-277
síntese de, 267, 267*f*, 275-276*f*
Glutamina sintetase/sintase, 267, 267*f*, 275-276, 275-276*f*
Glutaminase, no catabolismo de aminoácido nitrogenado, 275-277
Glutationa, 691
conjugação com, 679-681
Glutationa peroxidase, 118, 201, 201*f*, 204, 664, 664*t*
Glutationa redutase, 664, 664*t*
Glutationa redutase, via da pentose-fosfato no eritrócito e, 200, 201*f*
estado da riboflavina e, 535
Glutationa S-transferases, 67*f*
Glutationa-*S*-transferases, 679-680
GM-CSF. *Ver* Fatores de estimulação de colônias de granulócitos-macrófagos

GMP, 325*t*
cíclico, 327*f*, 328*t*
como mensageiro secundário, 327
conversão para IMP, 332, 334*f*
regulação de retroalimentação do, 335, 335*f*, 336
PRPP glutamil amidotransferase regulado por, 334, 335
GMP cíclico, 327, 327*f*, 481-482*t*
como mensageiro secundário, 327
como sinal intracelular, 504-505
formação, 504
papel no músculo liso, 622
GMPc (GMP cíclico), 481-482*t*
Golpe de potência, 612
Gonadotropina coriônica humana, 714-715, 714-715*t*
Gorduras, 141. *Ver também* Lipídeos
dietas ricas em, esteatose e, 251
metabolismo das, 152, 152*f*, 153*f*, 154
Gota, aguda, estudo de caso, 742-744
Gota, crônica, 742-744, 743*f*
Gota/artrite gotosa, 338, 743
Gotículas lipídicas, 246-248
GPCRs. *Ver* Receptores acoplados à proteína G
GPI. *Ver* Glicosilfosfatidilinositol
GPIIb-IIIa, na ativação plaquetária, 657, 658*f*
Gráfico de Dixon, 80
Gráfico de hidropatia, 463
Gráfico de Lineweaver-Burk
avaliação inibidora e, 79
K_m e $V_{máx}$ estimados a partir do, 76-77
Gráfico recíproco duplo e avaliação do inibidor, 79
Grampo (*hairpin*), 348, 348*f*, 451-452, 558-559
Gravidez
esteatose hepática da, 215
hipoglicemia durante, 194
necessidades de ferro durante, 635-636
Graxos saturados, 735
Grupo sanguíneo
definição, 668-669
sistemas, 668-669
substâncias, 568-569
Grupo sanguíneo A, substâncias de, 670-671
Grupo sanguíneo ABO e
aminoaçúcares em, 203, 204-205*f*
Grupo sanguíneo B, substâncias de, 669-670, 669-670*f*, 670-671
Grupos α-R, propriedades dos aminoácios afetadas por, 21-22
Grupos funcionais
média afetando o pK dos, 14
propriedades dos aminoácidos afetadas por, 21-22
reações químicas de aminoácidos afetadas por, 22-23
significado fisiológico dos, 12-13
Grupos prostéticos, 58-59
na catálise, 58-59
Grupos R, propriedades dos aminoácidos afetadas por, 21-22, 21*t*
GSH. *Ver* Glutationa
GSLs. *Ver* Glicoesfingolipídeos
GTP, 327, 556, 562, 564-565
na fosforilação, 114
proteínas de ligação, 253
GTPases, 552
monoméricas pequenas, 553, 565-566
GTPases monoméricas pequenas, 553, 565-566
Guanina, 325*t*
oxidada por ROS, 688*f*
Guanosina, 324*f*, 325*t*
na formação do ácido úrico, 338, 339*f*
pareamento de bases da, no DNA, 344, 345*f*
Guanosina difosfato, 570-571
Guanosina monofosfato. *Ver* GMP
L-Gulonolactona oxidase, 201

H

H_2S. *Ver* Sulfito de hidrogênio
Haplótipo, 98
Haptoglobina, 632, 632*t*, 633-634
HbA (hemoglobina A), P50 de, 50
HbA_{1c} (hemoglobina glicosilada), 55
HbF (hemoglobina fetal), P50 de, 50
HbM (hemoglobina M), 54, 399
HbS (hemoglobina S), 54, 399
hCG. *Ver* Gonadotropina coriônica humana
HDL. *Ver* Lipoproteínas de alta densidade
Hefaestina, 638
Helicases, DNA, 366*f*
Hélice
dupla, da estrutura do DNA, 9-10, 344-345, 345*f*
tripla, da estrutura do colágeno, 45, 45*f*
hélice α, 37-38
Hélices anfipáticas, 38
Hélice-volta-hélice, 428-429
Helicobacter pylori, 587
estômago, células epiteliais do, 587*f*
úlceras associadas ao, 517
Hemácias. *Ver também* Eritrócitos
derivadas de células-tronco hematopoiéticas, 660, 661
esquema de diferenciação, 662*f*
doenças afetando, 660, 661*t*
funções das, 661-662
membrana das
análise de SDS-PAGE, 666-667, 667-668*f*
informação bioquímica sobre, 666-667*t*
proteínas do citoesqueleto periférico, 667-668*t*, 668-669
proteínas integrantes da, 666-668, 667-668*f*, 667-668*t*
metabolismo das, 663*t*
produção de oxidantes, 664, 665
reticulócitos e síntese de proteínas, 663, 664
transporte de glicose, 663
produção de
eritropoetina regulando, 662
tempo de vida das, 662
transporte de glicose, 663, 664*t*
Hemaglutinina, 587
Hematúria, 724-725*t*
Heme, 45, 48, 49*f*, 55
catabolismo do, bilirrubina produzida por, 314-315, 315*f*
distúrbios do, 313*t*, 314*f*
síntese do, 308-311, 310*f*-312*f*
ALA-sintase, 309-311
incorporação do ferro ferroso na protoporfirina, 309
Heme-sintase (ferroquelatase), 309, 312*f*
na porfiria, 313*t*
Hemiacetal, 133-134
Hemiconexina, 475-476*f*
Hemina, 314, 315*f*
Hemocromatose, 521
artropatia da, 745
hereditária, 744-746
penetrância da, 745
secundária, 747
Hemocromatose hereditária, 640
estudo de caso, 744-746
Hemodiálise, 741
Hemofilia A, 655
Hemofilia B, 655
Hemoglobina, 48-55, 630*f*
afinidades ao oxigênio, 54
alterações conformacionais e de oxigenação, 51
apoproteína, 51
2,3-bisfosfoglicerato estabilizando, 51*f*
adaptação-altas altitudes e, 54
curva de dissociação do oxigênio, 50
estrutura tetramérica da, 48
mudanças na, durante o desenvolvimento, 51
extracorpuscular, ligação à haptoglobina, 632*t*, 633-634
hemoglobina A_{1c} (hemoglobina glicosilada), 54
hemoglobina F (hemoglobina fetal), P50 de, 50
hemoglobina Hikari, 399, 399*f*
hemoglobina M, 54, 399
hemoglobina Milwaukee, 398
hemoglobina S, 54-55, 399
hemoglobina-(HbA), P50 de, 50
mutações, 54-55, 399
no transporte de prótons, 53-54
no transporte do dióxido de carbono, 53*f*
no transporte do oxigênio, 48-50
propriedades alostéricas da, 50
síntese de bilirrubina e, 314, 315*f*
Hemoglobina, propriedades alostéricas, 50
Hemoglobina Chesapeake, 54
Hemoglobina fetal, P50 da, 50
Hemoglobina glicada (HbA_{1c}), valores de referência para, 727*t*
Hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}), 55
Hemoglobina Sydney, 398
Hemoglobinopatias, 54
Hemoglobinúria, 724-725*t*
paroxística noturna, 477*t*
Hemoglobinúria paroxística noturna, 477*t*, 581, 661*t*
Hemólise, 661*t*
Hemolisinas, 665-666
Hemopexina, 632*t*
Hemoproteínas, 308*t*
Hemossiderina, 635-636
Hemostasia, 650-659. *Ver também* Testes laboratoriais na avaliação da coagulação (sangue), 659
fases da, 650
Heparan sulfato, coagulação/trombose afetada por, 657
Heparina, 138, 138*f*, 594, 601-602, 655
atividade da antitrombina III afetada pela, 655
estrutura da, 598*f*
lipoproteínas e lipases hepáticas afetadas pela, 240, 242
Heparina/heparan sulfato, 595
Heparinas de baixo peso molecular, 655
Hepatite, 163
icterícia na, 318*f*, 319*t*
Hepatócitos
síntese do heme nos, 309
ALA-sintase na regulação dos, 309-311, 312*f*
Hepcidina, 521, 636, 745
ferroportina, 745, 745*f*
inibição da absorção de ferro pelos enterócitos, 745
liberação de ferro dos macrófagos, 745

Heptoses, 132-133, 133-134*t*
Heterocromatina, 358
Heterocromatina constitutiva, 358
Heterocromatina facultativa, 358
Heterodímero, 40
Hexapeptídeo, na síntese de albumina, 633-634
Hexoquinase, 190*t*
  na biossíntese do glicogênio, 178-179, 190*t*
  na glicólise, 171, 172*f*, 190*t*
    como reação de geração de fluxo, 157
    regulação e, 174
  na regulação da glicose sanguínea, 193, 193*f*
  no metabolismo da frutose, 201, 203*f*
Hexosaminas (aminoaçúcares), 136-137, 136-137*f*
  glicose como precursor das, 203, 204-205*f*
  inter-relação no metabolismo das, 204-205*f*
  nos glicoesfingolipídeos, 203, 204-205*f*
  nos glicosaminoglicanos, 136-137, 204-205*f*, 721-722
Hexoses, 134-135, 135*t*
  importância fisiológica das, 134-135, 135*t*
  metabolismo das, 197-203, 198*f*, 199*f*, 201*f*. *Ver também* Via das pentoses-fosfato
  nas glicoproteínas, 135*t*
HhaI, 435-436*t*
Hialuronidase, 600-601
Hibridização, 346, 439-441, 451-452
Hibridização *in situ* fluorescente, 442-443
Hibridomas, 648
Híbridos de RNA-RNA, 352
Hidrocortisona. *Ver* Síntese do cortisol
Hidrolases, 58-59
  éster de colesteril, 254-255
  fumarilacetoacetato, defeito nas, na tirosinemia, 287
  gliconolactona, 199, 199*f*
Hidrólise (reações hidrolíticas), 10-11. *Ver também* reações específicas
  da ligação de GTP para GDP, 562, 564
  dos triacilgliceróis, 229-230
  energia livre da, 111, 112*t*
  na glicogenólise, 178-179*f*, 180
Hidroperoxidases, 117
Hidroperóxidos, 225-226, 227*f*
3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA
  na cetogênese, 211-212, 212-213*f*
  na síntese do mevalonato, 251, 252*f*
3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMGCoA) liase
  deficiência de, 215
  na cetogênese, 211-212, 212-213*f*
3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMGCoA) redutase
  na síntese do mevalonato, 251, 251*f*
  síntese de colesterol controlada por, 251, 254*f*
3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMGCoA) sintase
  na cetogênese, 211-212, 212-213*f*
  na síntese do mevalonato, 251, 251*f*
L(+)-3-Hidroxiacil-CoA-desidrogenase, 209-210, 209-210*f*
Hidroxianisol butilado (BHA), 148
3-Hidroxiantranilato dioxigenase/oxigenase, 118
D-3-Hidroxibutirato-desidrogenase, 210, 211-212*f*
24-Hidroxicalcidiol (24,25-di-hidroxivitamina D_3), no metabolismo da vitamina D, 532*f*
25-Hidroxicolecalciferol (calcidiol), no metabolismo da vitamina D, 532*f*
4-Hidroxidicumarina (dicumarol), 532
p-Hidroxifenilpiruvato, no catabolismo da tirosina, 287, 289*f*
p-Hidroxifenilpiruvato-hidroxilase, 284*t*
P_i, 637
  na contração muscular, 614, 624*f*
  pI (pH isoelétrico), carga resultante de aminoácidos e, 20-21
Hidroxilação, 676-677
  na modificação covalente, aumentos de massa e, 31*t*
7α-Hidroxilase, esterol, 256-257
27-Hidroxilase, esterol, 256-257
Hidroxilases, 118
  na síntese do cortisol, 484-485
Hidroxilases de hidrocarbonos aromáticos, 678-679
Hidroxilisina, síntese de, 269
Hidroxilisinas da molécula de pró-colágeno, glicosilação das, 592
5-Hidroximetilcitosina, 326, 326*f*
Hidroxiprolina, 591, 593
  catabolismo da, 286-287, 288*f*
  síntese de, 269, 269*f*
4-Hidroxiprolina desidrogenase, defeito na, na hiper-hidroxiprolinemia, 286
15-Hidroxiprostaglandina desidrogenase, 225-226
Hidroxitolueno butilado (BHT), 148
5-Hidroxitriptamina. *Ver* Serotonina
HindIII, 435-436*t*
Hiperalfalipoproteinemia, familiar, 258-259*t*
Hiperargininemia, 279-280
Hiperbilirrubinemia, 317-320, 319*t*
  icterícia causada por, 317
  não conjugada e conjugada, causas da, 319*t*
  níveis elevados de bilirrubina não conjugada no sangue, 319
Hiperbilirrubinemia conjugada, causas de, 318-319, 317*t*
Hiperbilirrubinemia de regurgitação, 317
Hiperbilirrubinemia de retenção, 317
Hiperbilirrubinemia não conjugada, 319*t*
Hiperbilirrubinemia tóxica, 318
Hipercolesterolemia, 238, 240, 242
  da carga de frutose no fígado, 204
Hipercromicidade da desnaturação, 345
Hiperesplenismo, 665-666*t*
Hiperfenilalaninemias, 288
Hiperglicemia, 739-740. *Ver também* Diabetes melito
Hiper-hidroxiprolinemia, 286
Hiper-homocisteinemia, suplementos de ácido fólico na prevenção da, 538-539
Hiperlacticacidemia, 246
Hiperlipidemia, niacina para, 529
Hiperlipoproteinemias, 238, 258-259, 258-259*t*
Hiperlisinemia, periódica, 290
Hiperlisinemia periódica, 290
Hipermetabolismo, 170, 523-524
Hipermetioninemia, 300
Hiperornitinemia, hiperamonemia, e síndrome da homocitrulinúria, 279-280
Hiperoxalúria, primária, 285
Hiperprolinemias, tipos I e II, 283, 284*t*, 285*f*
Hipertensão, 751
Hipertermia, maligna, 608, 615, 616*f*, 618-619*t*
Hipertermia maligna, 615, 616*f*, 618-619*t*
Hiperuricemia, 338, 743
  homens na , 743
Hipoalbuminemia, 748
Hipófise anterior, hormônios da glândula afetados pelo nível de glicose, 194
Hipoglicemia, 187, 741
  induzida por frutose, 204-205
  oxidação de ácidos graxos e, 207-208, 214-215
Hipoglicina, 207-208, 215
Hipolipoproteinemia, 238, 258-259, 258-259*t*
Hipotálamo, 747, 753
Hipótese do batimento cardíaco, 693-694
Hipótese do sinalizador, da ligação de polirribossomos, 550*f*, 555-557, 555*t*
Hipótese óperon/óperon, 413-416, 413*f*
Hipotireoidismo congênito, 747
Hipotireoidismo primário, 747*t*
Hipotireoidismo terciário, 748
Hipotiroidismo, 145
  primário, estudo de caso, 746-747
Hipotiroidismo secundário, 747
Hipouricemia, 339
Hipoxantina, 326, 326*f*
Hipóxia, 711
Hipóxia, produção de lactato e, 170, 173-174
Histamina, 672*t*
  formação da, 299
Histidase (Histidina amônia liase), 283, 284*t*
Histidina, 19*t*, 22, 299, 299*f*
  catabolismo da, 283, 286*f*
  descarboxilação da, 299, 299*f*
  na ligação com oxigênio, 50*f*
  necessidades para, 524
  resíduos conservados e, 63*t*
Histidina 57, na catálise covalente, 62
Histidina amônia liase (Histidase), 283, 284*t*
Histidina distal (histidina E7) na ligação do oxigênio, 49
Histidina E7, na ligação com o oxigênio, 49
Histidina F8
  na ligação com o oxigênio, 49
  substituição de, na hemoglobina M, 54
Histidina proximal (histidina F8)
  na ligação do oxigênio, 48
  substituição da, na hemoglobina M, 54
Histidinemia, 283, 284*t*
Histonas, 355-356, 355*f*, 357*t*
  acetilação das, 710
Histonas H1, 355, 355*f*
Histonas H2A, 355, 355*f*
Histonas H2B, 355, 355*f*
Histonas H3, 355, 355*f*
Histonas H4, 355, 355*f*
Histórias de casos bioquímicos, 729-757
  câncer colorretal, 734-736
  citoacidose diabética, 738-741
  cólera, 733-734
  deficiência de adenosina desaminase, 730-731
  distrofia muscular de Duchenne, 739-741
  doença de Alzheimer, 730-733
  fibrose cística, 736-738
  gota aguda, 742-744
  hemocromatose hereditária, 744-746
  hipotiroidismo, 746-747
  infarto do miocárdio, 749-750
  intoxicação aguda por etanol, 741-742
  Kwashiorkor, desnutrição de proteína-energia (PEM), 747-749
  obesidade, 750-753
  osteoporose primária (pós-menopausa), 753-755
  xeroderma pigmentoso, 755-756

HIV protease, na catálise ácido-base, 61
HMG-CoA. *Ver* 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA
HMM. *Ver* Meromiosina pesada
HNCC. *Ver* Câncer de colo não poliposo hereditário
Holocarboxilase sintetase, biotina como coenzima da, 540
Homeostase
  no RE, 559-560
  sangue na manutenção da, 629
Homocarnosina, 299, 300*f*, 303
Homocarnosinose, 304
Homocisteína
  deficiência de folato funcional e, 537
  na síntese de cistina e homossiderina, 269, 269*f*
Homocistinúrias, 286
  deficiência de vitamina B_{12}/ deficiência de folato funcional e, 537
Homodímeros, 40
Homogentisato, no catabolismo da tirosina, 287, 289*f*
Homogentisato dioxigenase/oxidase, 118
Homogentisato oxidase, 284*t*
  deficiência de, na alcaptonúria, 284*t*, 287, 289*f*
Homologia, 99
  modelação, 43
  na classificação de proteínas, 36
  resíduos conservados e, 63
Homosserina, síntese da, 269, 269*f*
Hormônio da tireoide
  regulação da expressão do gene por, 500*f*
Hormônio do crescimento, transporte de aminoácidos afetado
Hormônio esteroide como molécula precursora, 481-482
Hormônio estimulador da tireoide
  determinação do, 724-725, 728, 728*t*
  valores de referência para, 727*t*
Hormônio liberador de tireotropina, 747
Hormônio pré-pró-paratireoidiano bovino, 493*f*
Hormônios, 568-569, 748. *Ver também* Hormônios específicos
  armazenamento e secreção dos, 495
  características dos, 481-482*t*
  como mensageiro secundário, 480-481, 481-482*t*
  definição, 478-479
  difusão facilitada regulada por, 469
  diversidade química dos, 481-483, 482-483*f*
  estimulando-adenilil-ciclase, 502*t*
  ligação à receptores intracelulares, 480-481, 481-482*t*
  ligação-receptores de superfície celular, 480-481, 481-482*t*
  lipofílicos, 480-481
  metabolismo lipídico regulado por, 246-248, 247-248*f*
  molécula precursora para, 481-482
  na regulação da glicose sanguínea, 193
  no controle metabólico, 157*f*, 158
  proteínas plasmáticas no transporte dos, 495-496
  respostas coordenadas para estímulo, 499-500, 500*f*
  síntese dos, 482-483
    a partir da tirosina, 488-489
    angiotensina II, 492-494
    esteroidogênese ovariana, 485, 487-488
    esteroidogênese suprarrenal, 483-485, 487
    esteroidogênese testicular, 485, 487
    família POMC, 494
    insulina, 491
    metabolismo do iodo e, 491
    $1,25(OH)_2$-D_3, 487-488
    precursores peptídeos para, 491
    PTH, 491-492
    tetraiodotironina, 489-491
    tri-iodotironina, 489-491
  solúvel em água, 480-481
  vitamina D como, 527
Hormônios da hipófise. *Ver também* tipo específico
  glicose sanguínea afetada por, 194
Hormônios da tireoide , 489-491
  na lipólise, 246-247, 247-248*f*
Hormônios hidrofílicos, 495
Hormônios hidrossolúveis, 480-481
Hormônios lipofílicos, 480-481
Hp. *Ver* Haptoglobina
HpaI, 435-436*t*
HPETE. *Ver* Hidroperóxidos
HPLC. *Ver* Cromatografia líquida de alta eficiência
HREs. *Ver* Elementos de respostas hormonais
hsp60/hsp70, como chaperonas, 44
5-HT (5-hidroxitriptamina). *Ver* Serotonina

I

I. *Ver* Iodo/iodeto
Ibuprofeno, 24, 216-217, 224-225
IC_{50}, 80
Icterícia (icteros), 317, 319*t*
Icterícia acolúrica, 317
Icterícia colestática, 318
Icterícia colúrica, 318
Icterícia fisiológica (neonatal), 317-318
Icterícia não hemolítica congênita (síndrome de Crigler-Najjar tipo I), 318
Icterícia neonatal (fisiológica), 317-318
Icterícia pós-hepática, 318*f*
Icterícia pré-hepática, 319*f*
Icterus (icterícia), 317, 319*t*
IDDM. *Ver* Diabetes melito insulino-dependente
Idiotipos, 647
IDL. *Ver* Lipoproteínas de densidade intermediária
L-Iduronato, 135, 135*f*
IEF. Foco isoelétrico
IgA, 645*t*, 647*f*
IgD, 645*t*
IgE, 645*t*
IgG, 645*t*
IgM, 645*t*, 647*f*
Íleo meconial, 737
Ilhotas de Langerhans, insulina produzida pelas, 193
Ilhotas pancreáticas, insulina produzida pelas, 193
Imatinibe, 715-716, 715*t*
IMP (inosina monofosfato)
  conversão para AMP e GMP, 332, 333*f*
    regulação de retroalimentação, 335, 335*f*
  síntese de, 332-334, 333*f*, 334*f*
Importinas, 552, 553*f*
Impressão digital, DNA, 451-452
Impressão digital do DNA, 451-452
Impulsos nervosos, 473-474
Imuglobulina, 730
Imunidade inata, 644
Imunidade mediada por células, 644
Imunoensaios ligados-enzimas, 64
Imunogenicidade, diminuição, 648
Imunoglobulina monoclonal, 714-715, 714-715*t*
Imunoglobulinas, 629, 632*t*, 645, 645*t*. *Ver também* tipo específico de Ig
  classes de, 645*t*
  doenças causadas por superprodução ou subprodução de, 647-648
  estrutura das, 647*f*
  funções das, 645, 645*t*
  genes para. *Ver* Genes de imunoglobulinas
  hibridomas como fontes de, 648
  mudança de classe e, 647
Imunologia, 1
Inanição, 109
  aspectos clínicos da, 161
  cetose na, 215
  esteatose hepática e, 243-244
  mobilização do combustível metabólico na, 160-161, 160*f*, 160*t*
  redirecionamento do triacilglicerol e, 240, 242
Índice de massa corporal, 522
Índice glicêmico, 137, 518
Indol, coeficiente de permeabilidade do, 463*f*
Indometacina, ciclo-oxigenases afetadas por, 224-225
Indução enzimática, 678-681
  citocromo P450 e, 314
  na regulação da gliconeogênese, 190, 190*t*
Indutores
  gratuitos, 414
  na regulação da expressão do gene, 413
  síntese de enzimas afetada por, 86-87
    na regulação da gliconeogênese, 190
Indutores gratuitos, 414
Infarto do miocárdio
  enzimas auxiliando no diagnóstico do, 66
  estudo de caso, 749-750
  etiologia do, 751*f*
Infarto do miocárdio, isoenzimas de lactato desidrogenase
  no diagnóstico do, 65, 66
Infecção, 749
  perda de proteínas e, 523-524
Infecção pulmonar/insuficiência cardíaca, 737
Infecção viral, 560-561, 739-740
Infecções broncopulmonárias recorrentes, 737
Infecções parasitárias, 665-666
Infecções recorrentes, 585, 644
Inflamação, 216-217, 648
  complemento na, 648-649
  prostaglandinas na, 216-217
  proteínas de fase aguda na, 632
Inflamação aguda
  biomoléculas com propriedades vasoativas, envolvidas na, 672*t*
Inflamação crônica, 715-716
Influências genéticas, na obesidade, 753
Influenza aviária, vírus da (H5N1), 587
  representação esquemática de, 587
Influenza vírus A, 587
Informação do transcriptoma, 447, 449
Inibição
  baseada no mecanismo, 80
  competitiva *versus* não competitiva, 78-80
  irreversível, 80
  ligada fortemente, 80
  retroalimentação, na regulação alostérica, 87-88, 88*f*
Inibição baseada no mecanismo, 80

Inibição competitiva, diferenciada da inibição não competitiva, 78-80
Inibição da atividade colinesterase, 730
Inibição da fertilização, 583
Inibição de retroalimentação
na regulação alostérica, 87-88, 88*f*, 157*f*
Inibição irreversível, enzima, 80
Inibição não competitiva, competitiva, 78-80
Inibidor de panproteinase, 643
Inibidor de serino protease, 641
Inibidor-1, 182, 183*f*, 184, 184*f*
Inibidores da via do fator tecidual, 651
Inibidores de enzimas, medicamentos como, 82
Inibidores de ligação forte, 80
Inibidores de tirosina-quinase, 715-716
Inibidores do sinal de transdução, 715-716*t*
Iniciação
na síntese de proteínas, 401, 402*f*
na síntese de RNA, 378-379
na síntese do DNA, 368*f*, 370-371*f*
Iniciação da cadeia. *Ver também* Iniciação
no ciclo de transcrição, 379*f*, 380*f*
Inosina monofosfato (IMP)
conversão para AMP e GMP, 332, 333*f*
regulação de retroalimentação de, 335, 335*f*
síntese do, 332-334, 333*f*, 334*f*
Inositol hexafosfato (ácido fítico), absorção do cálcio afetada por, 521
Inositol trisfosfato, 145
na ativação plaquetária, 657, 658*f*
Inr. *Ver* Sequência de iniciação
Inserção cotraducional, 556, 556*f*, 557
Inserção de intensificador, 701, 701*t*
Inserção do promotor, 701, 701*t*, 702*f*
Instabilidade cromossômica, 706, 706*f*
Instabilidade genômica das células cancerígenas, 706
Instabilidade microssatélite, 361-362, 706
Insuficiência cardíaca, 145, 608
na deficiência de tiamina, 534
Insuficiência da imunidade humoral e celular, 730
Insuficiência pancreática, na deficiência de vitamina B_{12}, 537
Insulina, 151, 482-483, 565-566
ácidos graxos livres afetados pela, 238, 246-247
armazenamento da, 495*t*
deficiência de, 194. *Ver também* Diabetes melito
fosforilase b afetada pela, 182
iniciação da síntese de proteínas afetadas pela, 403-404, 404-405*f*
metabolismo do tecido adiposo afetado pela, 246-247
na glicólise, 171, 190
na regulação da glicose sanguínea, 192-194
na regulação da lipogênese, 222
na regulação da lipólise, 222, 246*f*, 246-247, 247-248*f*
nas reservas de combustível metabólico, 158
no transporte de glicose, 469
síntese, 491
transmissão de sinal pela cascata de quinases, 507, 508*f*
Integração, cromossomal, 363-364, 363-364*f*
Integração sítio-específica, 363-364
Integrinas
leucócitos, 672, 672*t*
neutrófilos, 672, 672*t*
plaquetas, 672, 672*t*
Interação de medicamentos, 678-679
Interação hormônio–receptor, 499
Interações célula endotelial - leucócitos, 583*t*
Interações célula-célula, 459
Interações celulares neutrófilo-células endoteliais
esquema das, 584*f*
Interações hidrofóbicas, 9-10
Interações proteína-DNA, bacteriófago lambda como paradigma para, 416-420, 416*f*, 417*f*
Interações proteína-DNA, bacteriófago lambda como paradigma para, 416-420, 416*f*, 417*f*
Interleucinas, 661
Interrupção/*knockout* direcionada ao gene, 447, 449
Interrupção/*knockout* gênica, no alvo, 447, 449
Interruptores moleculares, 562, 564
Intervalo QT, longo congenitamente, 477*t*
Intervenção coronária percutânea, 750
Intestino delgado, digestão de monossacarídeos no, 518
Intolerância à frutose, hereditária, 204-205
Intolerância ao leite (lactose), 132-133, 517, 518
Intoxicação pelo etanol, aguda, estudo de caso, 741-742
Intoxicação por chumbo, inibição da ALA desidratase e, 308
Intravasação, 712
Íntrons (sequências de intervenção), 360, 360*f*, 364, 390, 396, 451-452
remoção do transcrito primário, 390*f*
Inulina, 137
Iodo/iodeto, 541
5-Iodo-2′-desoxiuridina, 328*f*
Iodopsina, 527
5-Iodouracila, 328
Ionização e dessorção à *laser* assistida por matrix, 31, 33*f*
na espectrometria de massa, 32
Ionóforos, 129, 472
Íons de mercúrio, metabolismo do piruvato afetado por, 176
Íons de metal, nas reações enzimáticas, 59
Iontoforese pela pilocarpina, 736
IP3. *Ver* Inositol trisfosfato
IPTG. *Ver* Isopropiltiogalactosídeo
IRES. *Ver* Sítio de entrada ribossomal interno
Isoaspartil metiltransferase, 693-694*f*
Isocitrato desidrogenase, 165, 165*f*
na produção de NADPH, 219, 219-220*f*
Isoenzimas. *Ver* Isozimas
Isolantes, 428-429
lipídeos não polares como, 140
Isoleucina, 18*t*
catabolismo da, 293, 294*f*, 295*f*
interconversão da, 269
requisitos para, 524
Isomaltose, 137*t*
Isomerases, 58-59
Isomerismo
de açúcares, 133-135, 133-134*f*
geométrico, dos ácidos graxos insaturados, 143, 143*f*
Isomerismo D, 133-134, 133-134*f*
Isomerismo de esteroides, 146, 146*f*
Isomerismo geométrico, de ácidos graxos insaturados, 143, 143*f*
L-Isomerismo, 133-134, 133-134*f*
Isopentenil difosfato, na síntese do colesterol, 251, 252*f*
Isoprenoides, síntese dos, 251, 252*f*
na síntese do colesterol, 253*f*
Isopropiltiogalactosídeo, 414
Isoprostanos (prostanoides), 142, 148
via da ciclo-oxigenase na síntese dos, 224-226, 225-226*f*
Isotipos, 647
Isótopos. *Ver também* tipos específicos
na análise das proteínas plasmáticas, 631
Isovaleril-CoA desidrogenase, 284*t*
na acidemia isovalérica, 293
Isozimas, 63
Isquemia, 170, 475-476
Isquemia total do miocárdio, 750

J

Janela diagnóstica, 66
Jangadas lipídicas, 466, 564-566
Junções *gap*, 475-476, 475-476*f*
diagrama esquemático das, 475-476*f*

K

K. *Ver* Constante de dissociação; Potássio
k. *Ver* Constante de velocidade
K_{cat}. *Ver* Constante catalítica
K_{cat}/K_m. *Ver* Eficiência catalítica
K_d. *Ver* Constante de dissociação
K_{eq}. *Ver* Constante de equilíbrio
Kernicterus, 318
K_m. *Ver* Constante de Michaelis
K_w. *Ver* Produtos de íon
Kwashiorkor, 265, 522, 748
características do, 748
estudo de caso de desnutrição proteína-energia, 747-749
Kwashiorkor marasmático, 748

L

L-Aminoácidos nas proteínas, 18-19
Lactação, cetose na, 161
Lactase, 132-133, 518
deficiência de (lactose/intolerância ao leite), 517
Lactato
formação, 741
glicólise anaeróbia e, 170, 172*f*, 173-174
hipóxia e, 173-174
Lactato desidrogenase, 39
isozimas, 66
isozimas, significado diagnóstico das, 65*t*, 66, 66*f*
na glicólise anaeróbia, 173
Lactoferrina, 670-671*t*
Lactose, 132-133, 136-137*f*, 137*t*, 201-203
galactose na síntese da, 201-202, 204*f*
intolerância, 132-133, 517, 518
metabolismo da, hipótese do óperon e, 413-416, 413*f*
Lactose sintase, 203, 204*f*
Lactulose, 137*t*
LAD II (deficiência da adesão de leucócitos tipo II), 584
Lâminas basais, 595
Laminina, 595
interação celular, representação esquemática da, 595*f*
Langerhans, insulina produzida por ilhotas de, 193
Lanosterol, na síntese do colesterol, 251, 252, 253*f*
LBD (domínio de ligação ao ligante), 511

LBD. *Ver* Domínio de ligação do ligante
LCAT. *Ver* Lecitina:colesterol aciltransferase
LCRs. *Ver* Regiões de controle do *locus*
LDL. *Ver* Lipoproteínas de baixa densidade
LDL oxidada, 750
LEC. *Ver* Líquido extracelular
Lecitina. *Ver também* Metabolismo da fosfatidilcolina, 233-234*f*
Lecitina:colesterol aciltransferase, 233-234, 240, 242, 242-243*f*, 255-256
  deficiência familiar de, 258-259*t*
Lecitina dipalmitoil, 145
Lecitinas (fosfatidilcolinas), 139, 144, 145*f*, 572-573
  assimetria da membrana e, 464
  exemplos/comentários, 572-573*t*
  plantas, 572-573*t*
  síntese das, 230, 231*f*
Lei de Coulomb, 8-9
Leis da termodinâmica, 109-110
  interações hidrofóbicas e, 9-10
Leitores do código, 421
Lentes dos olhos, frutose e sorbitol nas, catarata diabética e, 205-206
Leptina, 246-247
Lesão celular (citotoxicidade), 681-682, 681-682*f*
Lesão celular, papel do ROS na, 665
Lesões do DNA, 690
Leucemia mielocítica aguda, 707
Leucemias, 660
Leucina, 18*t*
  catabolismo da, 293, 294*f*
  interconversão da, 269
  requisitos para, 523-524
Leucina aminomutase, 537
Leucócitos, 583
  taxa de reposição, 686*t*
  valores de referência para, 727*t*
Leucócitos. *Ver também* tipo específico
  integrinas nas, 672, 672*t*
  produção, fatores de crescimento regulando, 663
Leucodistrofia, metacromática, 235*t*
Leucodistrofia metacromática, 235*t*
Leucotrienos, 142, 143*f*, 224-227
  leucotrieno A4, 143*f*
  significado clínico dos, 225-227
  via da lipo-oxigenase na formação dos, 24, 225-226, 225-227*f*
Leucovorina, 538-539
Leve, fonte de energia no transporte ativo, 472
Liases, 58-59
LIC. ver Líquido intracelular
Ligação, 451-452
Ligação ao molde, na transcrição, 379
Ligação ao *O*, 573*f*
Ligação cooperativa
  descrição da equação de Hill, 76
  hemoglobina, 51
    efeito Bohr na, 53
Ligação de extremidade cega/ DNA de extremidade cega, 437-438
Ligação do heme, 633-634
Ligação do isoaspartil no esqueleto do polipeptídeo, 693-694*f*
Ligação final adesiva/ DNA de final adesivo, 436-437, 436-437*f*
Ligação genética. *Ver* Análise de ligações genéticas, 1
Ligação glicosídica *O*, 572-573, 591
Ligação *N*-glicosídica, 572-573
Ligações. *Ver* tipos específicos
Ligações covalentes
  interação da membrana lipídeo-proteína e, 463
  moléculas biológicas estabilizadas por, 8-10, 8-9*t*
Ligações *Cro*, 419
Ligações cruzadas, 610, 622
Ligações cruzadas covalentes, 591
Ligações cruzadas proteína-proteína e glicação de proteína, 691*f*
Ligações de fosfodiéster, 328-329
Ligações de hidrogênio, 7, 8-9*f*
  no DNA, 344, 345, 345*f*
Ligações de sais (eletrostáticas), 9-10
  ruptura da ligação do oxigênio, prótons do efeito Bohr e, 53*f*
Ligações/interações eletrostáticas, 9-10. *Ver também* Ligações de sais (eletrostáticas)
  ruptura da ligação do oxigênio, prótons do efeito Bohr e, 50
Ligantes, 101-102
Ligases, 58-59, 560-561
Limiar renal para glicose, 194
Limitação da velocidade de reação, metabolismo regulado por, 86-87
LINEs. *Ver* Sequências de repetição intercaladas longas
Linfócitos, 747. *Ver também* Linfócitos B; Linfócitos T
Linfócitos B
  na produção do hibridoma, 644
Linfócitos T, 644, 730
Linfoma de Burkitt, translocação recíproca em, 702*f*
Linha Z, 609, 610*f*
Linhas, definição de, 451-452
Lipase gástrica, 519
Lipase hepática, 241
  deficiência de, 258-259*t*
  na captação da quilomícrons remanescente, 241*f*, 240, 242
Lipase lingual, 518
Lipase lipoproteica, 155, 155*f*, 241*f*, 240, 242, 242-243*f*, 601-602
  deficiência familiar de, 258-259*t*
  envolvimento na captação do remanescente, 240, 242
Lipase pancreática, 519
Lipase sensível-hormônio, 246, 246*f*
  insulina afetando, 246-247
Lipases
  na digestão, 518, 519
  no metabolismo do triacilglicerol, 229-230, 246, 246*f*, 518, 519
  significado diagnóstico das, 65*t*
Lipídeos, 141-150. *Ver também* tipo específico
  ácidos graxos, 141-144
  anfipáticos, 148, 149*f*
  assimetria dos, conjunto de membrana e, 565-566, 566-567*f*
  classificação dos, 141
  complexos, 141
  derivados, 141
  digestão e absorção dos, 518-519
  distúrbios associados às anormalidades dos, 475-476
  esteroides, 146-148, 146*f*, 147*f*
  fosfolipídeos, 141, 144-145, 144*f*
  glicolipídeos, 141, 145-146, 146*f*
  interconvertibilidade dos, 158
  metabolismo dos, 152, 153*f*, 155, 155*f*. *Ver também* Lipólise
    no estado alimentado, 160
    no fígado, 243-244, 244-245*f*
  nas membranas, 460-464
  neutros, 141
  peroxidação dos, 147-148, 148*f*
  precursores, 141
  relação de proteínas para, na membrana, 460, 461*f*
  simples, 141
  taxa de reposição dos, membranas e, 565-567
  transporte e armazenamento dos, 238-239
    aspectos clínicos do, 243-246
    como lipoproteínas, 238-239, 238*t*, 239*f*
    deficiência de ácidos graxos e, 225-227
    fígado no, 243-244, 244-245*f*
    tecido adiposo e, 246, 246*f*
    tecido adiposo marrom e, 247-249, 249*f*
  triacilgliceróis (triglicerídeos), 144, 144*f*
Lipídeos anfipáticos, 148, 149*f*
  em lipoproteínas, 239, 239*f*
  em membranas, 148, 149*f*, 461-462, 461*f*
Lipídeos de membrana
  esteróis, 461
  formação da bicamada, 462-463, 462*f*, 463*f*
  fosfolipídeos, 460-461
  glicoesfingolipídeos, 461
  natureza anfipática dos, 461-462
Lipídeos neutros, 141
Lipidômicos, 4
Lipidoses (distúrbios do armazenamento de lipídeos), 234-235
Lipogênese, 155, 158, 216-219, 217*f*, 218*f*, 243-244, 247-248
  acetil-CoA para, 219
  complexo de ácido graxo sintase na, 217-219, 217*f*, 218*f*
  NADPH para, 219, 219-220*f*
  produção de malonil-CoA na, 217, 217*f*
  regulação da, 219-222, 221*f*
    enzimas na, 190*t*, 217-221
    estado nutricional na, 219
    mecanismos de curto e longo termos na, 219-222
Lipólise, 155, 155*f*, 246-248, 247-248*f*. *Ver também* Lipídeos
  hormônios que afetam-, 246-247, 247-248*f*
  insulina afetando a, 222
  lipase hormônio-sensível na, 246-247, 246*f*
  triacilglicerol, 229-230
Lipo-oxigenase, 225-226, 227*f*
  espécies reativas produzidas por, 148
5-Lipo-oxigenase, 225-226, 227*f*
Lipoproteínas, 36, 141, 155, 238-249, 238*t*, 239*f*, 629, 632*t*. *Ver também* tipos específicos
  carboidratos nas, 139
  classificação das, 238-239, 238*t*
  deficiência das, esteatose hepática e, 243-244
  distúrbios das, 258-260, 258-259*t*
  no transporte de colesterol, 255-256, 255-256*f*
  remanescentes, 238*t*, 241*f*, 240, 242
    captação hepática das, 240, 242
β-Lipoproteínas, 239. *Ver também* Lipoproteínas de baixa densidade
Lipoproteínas de alta densidade, 238*t*, 239
  apolipoproteínas das, 238*t*, 239
  aterosclerose e, 242-243, 257-258
  ciclos, 242-243

metabolismo das, 240, 242-244, 242-243*f*
receptor para, 242-243, 242-243*f*
relação para lipoproteínas de baixa densidade, 257-258
Lipoproteínas de baixa densidade, 238*t*, 239, 251, 255
apolipoproteínas das, 238*t*, 239
metabolismo das, 241*f*, 240, 242
receptores para, 240, 242
na captação da quilomicra remanescente, 241*f*, 240, 242
na inserção coducional, 557, 557*f*
regulação das, 254-259
relação com lipoproteínas de alta densidade, e aterosclerose, 257-258
Lipoproteínas de densidade intermediária, 238*t*, 240, 242, 255
Lipoproteínas de muito baixa densidade, 155, 238, 238*t*, 255-257
metabolismo das, 155, 155*f*, 240-240, 242, 241*f*
no estado alimentado, 160
no transporte de triacilglicerol, 240*f*, 241*f*
secreção hepática das, estado dietético e hormonal e, 243-244, 244-245*f*
Lipoproteínas plasmáticas. *Ver* Lipoproteínas
Lipossomos, 464, 465
lipídeos anfipáticos formando, 148, 149*f*
membranas artificiais e, 464-465
Lipoxinas, 142, 143*f*, 224-226
significado clínico das, 226-227
via da lipo-oxigenase na formação das, 225-226, 225-227*f*
Líquido celular. *Ver* Citosol
Líquido cerebrospinal (CSF), valores de referência para, 727*t*
Líquido extracelular, 460, 460*t*
Líquido intracelular, 460, 460*t*
Lise, complemento na célula, 648
Lise celular, complemento na, 649
Lisil hidroxilases, 591
deficiências dos, 593
na síntese de hidroxilisina, 269
Lisil oxidase, 591, 593
Lisina, 19*t*
catabolismo da, 290, 290*f*
pI da, 20
requisitos para, 524
Lisina hidroxilase, vitamina C como coenzima para, 540
Lisofosfatidilcolina, 145, 145*f*
Lisofosfolipase, 233-234, 233-234*f*
Lisofosfolipídeos, 145, 145*f*
Lisolecitina, 145, 145*f*, 233-234, 233-234*f*
Lisossomos, 577
entrada de proteínas no
entrada de proteínas no, distúrbios associados--defeitos nos, 560-561*t*, 566-567
na endocitose, 473-474
Lisozima, 39*f*, 670-671*t*
Lítio, 541*t*
D-Lixose, 134-135*f*
LMM. *Ver* Meromiosina leve
LMWHs. *Ver* Heparinas de baixo peso molecular
Locus operador, 413*f*, 414
Longevidade *versus* tempo de vida, 685
LRP. *Ver* Proteína relacionada ao receptor delipoproteínas de baixa densidade
LTs. *Ver* Leucotrienos
Lubrificar, 574-575
Luz do sol. *Ver* Luz ultravioleta
Luz ultravioleta
absorção de nucleotídeo da, 326-327
síntese da vitamina D e, 529
LXs. *Ver* Lipoxinas

M

α2-Macroglobulina, 642-643
Macromoléculas, transporte celular , 473-475, 473-476*f*
Magnésio, 541*t*
na clorofila, 307
no líquido extracelular e intracelular, 460, 460*t*
Malária, 588
Malato, 165*f*, 166
Malato-desidrogenase, 165*f*, 166
MALDI. *Ver* Ionização e dessorção à *laser* assistida por matriz
Maleilacetoacetato, no catabolismo de tirosina, 287, 289*f*
Malignidade/células malignas. *Ver* Câncer; Células neoplásicas
Malonato
inibição da succinato-desidrogenase pelo, 78
na cadeia respiratória, 127, 128*f*
Malonil-CoA, na síntese de ácidos graxos, 217, 217*f*
Malonil-transacilase, 217*f*, 218*f*, 219
Maltase, 518
Maltose, 136-137, 136-137*f*, 137*t*
Manganês, 541*t*
Manosamina, 203, 204-205*f*
D-Manosamina, 136-137
Manose-6-fosfate/sinal de manose 6-P
no fluxo proteico, 549*t*
D-Manose, 134-135*f*, 135*t*
Mapa de restrição, 447, 449
Mapa haplótipo (HapMap), 98
Mapeamento genético, 360
MAPs. *Ver* Proteínas associadas-microtúbulos
Marasmo, 109, 265, 522, 748
Marcadores SNPs, 98
MAT. *Ver* Metionina adenosiltransferase
Matriz
extracelular. *Ver também* componente específico
mitocondrial, 122, 164
Matriz extracelular. *Ver também* Matriz; componentes específicos
fibronectina, 594-595
papel na metástase, 712
processo de envelhecimento, 589
proteínas estruturais, 589
proteoglicanos, 589
tecido conectivo, 589
Matriz mitocondrial, 549, 551*f*
Maturação cisternal, 564-565
MBP. *Ver* Proteína de ligação de manose
MEC. *Ver* Matriz extracelular
Mecanismo pingue-Pongue, na difusão facilitada, 469, 470*f*
Mecanismos de reparo e revisão para o DNA, 691-692
Mecanismos de reparo molecular, teoria do envelhecimento do uso e abuso
dano proteico, 692
mecanismos de revisão e reparo, 691-692
mecanismos enzimáticos e químicos, 691
Mecanismos de translocação especial, 552
Mecanismos enzimáticos e espécies reativas de oxigênio (ROS), 691
Mecanismos epigenéticos
fatores envolvidos no, 710*f*
no câncer, 710
Mecanismos químicos e espécies reativa de oxigênio (ROS), 691
Medicamentos
como inibidores enzimáticos, 82
dose, 729
Medicina
preventiva, pesquisa bioquímica afetando a, 3
relação da, com bioquímica, 1-3
Medicina clínica. *Ver também* Testes laboratoriais (lab)
importância dos testes laboratoriais (lab) na, 719-720
Medicina forense
números variáveis de unidades de repetição em *tandem* na, 446-447
polimorfismos no comprimento do segmento de restrição na, 445-446
Medicina preventiva, pesquisa bioquímica afetando, 3
Medula óssea, na síntese do heme, 309
Meia-vida
enzima, 272-273
proteína, 272-273
proteínas do plasma, 632
MELAS, 130
Melatonina, biossíntese e metabolismo da, 303*f*
Membrana celular. *Ver* Membrana plasmática
Membrana glomerular, 595
Membrana mitocondrial externa, 122, 552
inserção de proteínas na, 552
Membrana mitocondrial interna, 122, 550
inserção de proteína na, 550
Membrana plasmática, 459-477, 565-566. *Ver também* Membranas
carboidratos na, 139
mutações na, doenças causadas por, 475-476, 477*t*
Membranas, 459-477
aparelho de Golgi na síntese das, 549
artificiais, 464-465
assimetria das, 460, 464
bicamadas das, 462*f*, 463-464
associação com proteínas de membrana, 463
biogênese da, 566-567, 566-567*f*, 566-567*t*
colesterol nas, 461
modelo do mosaico fluido e, 466
despolarização das, na transmissão do impulso nervoso , 473-474
esteróis nas, 461
estrutura das, 460-463, 460*f*
assimetria e, 464
modelo do mosaico fluido, 465-466, 465*f*
fluidez afetando, 466
fosfolipídeos nas, 144-145, 145*f*, 460-461, 461*f*
função das, 464-477
glicoesfingolipídeos nas, 461
intracelular, 460
lipídeos nas. *Ver também* Lipídeos de membrana anfipáticos, 148, 149*f*, 461-462, 462*f*
mutações afetando, doenças causadas por, 475-477, 477*t*
plasma. *Ver* Membrana plasmática
proteínas nas, 463-464, 471*t*. *Ver também* Proteínas de membrana
relação proteína:lipídeo nas, 460, 461*f*
seletividade das, 466-472, 467*t*, 468*f*, 470*f*, 471*f*, 471*t*

Membranas artificiais, 464-465
Membranas celulares, proteínas das, 568-569
Membranas intracelulares, 459
Membranas mitocondriais
  enzimas como marcadores de compartimento separado por, 122
  estrutura das, 122, 122*f*
  inserção de proteínas nas, 557
Memória de curto prazo, perda de, 731
Menadiol, 532
Menadiol diacetato, 532
Menadiona, 533. *Ver também* Vitamina K
Menaquinona, 533. *Ver também*Vitamina K
Mensageiros secundários, 88-89, 501, 501*f*. *Ver também* tipo específico
  AMPc como, 181
  GMPc como, 327
  precursores dos
    fosfatidilinositol como, 144*f*, 145
    fosfolipídeos como, 229-230
MEOS. *Ver* Sistema de oxidação do etanol microssomal dependente de citocromo P450
6-Mercaptopurina, 328, 328*f*
Meromiosina
  leve, 611
  pesada, 611
Meromiosina leve, 611
Meromiosina pesada, 611
Metabolismo, 110, 151-162, 161*t*. *Ver também* Catálise/reações catalíticas (enzimáticas); Via metabólica/fluxo de metabólito; tipos específicos
  circulação do sangue e, 153-155, 154*f*, 155*f*
  compartimentação e, 85-87
  controle de quantidade e, 86-87
  de fármacos, *in vivo*, 82
  erros inatos do, 2, 281
  integração do, combustíveis metabólicos e, 153-156
  modificação covalente e, 87, 89, 90*f*, 91
  no nível de tecidos e órgãos, 153-155, 154*f*, 161*t*
  no nível subcelular, 155-156, 156*f*
  reações de transferência de grupo no, 10-11
  reações limitadoras de taxa e, 86-87
  regulação alostérica e, 87-88, 88*f*, 157, 157*f*
  regulação do, 85*f*, 86-87, 157, 157*f*
    enzimas na, 157, 157*f*
    mecanismos alostéricos e hormonais na, 87-88, 88*f*, 157-158, 157*f*
Metabolismo, aeróbio, 750
Metabolismo da glicose, 152-153, 153*f*, 171-173, 172*f*, 174*f*, 192, 192*f*. *Ver também* Gliconeogênese; Glicólise
Metabolismo de medicamentos, *in vivo*, 82
Metabolismo do cálcio, 505
Metabolismo do fosfatidilinositídeo e ação do hormônio dependente de cálcio, 506, 507
Metabolismo do γ-Hidroxibutirato, 305, 305*f*
Metabolismo do heme, distúrbios genéticos do, 312-314
Metabolismo do iodeto
  e síntese de hormônios, 491
  no folículo tireoidiano, 490*f*, 491
Metabólitos polares, 676-677
Metabolômicos, 4
Metacrilil-CoA, catabolismo da, 294*f*
Meta-hemoglobina, 54, 399, 665-666
Meta-hemoglobinemia, 54, 661*t*, 665-667
Metaloenzimas, 59
Metaloflavoproteínas, 116
Metaloproteínas, 36
Metalotioneínas, 640-641
Metástase, 568-569, 712*t*
  anormalidades da membrana e, 477*t*
  e câncer, 711-714
  esquema simplificado da, 711*f*
  genes estimuladores, 712
Metemoglobinemia maçica aguda, 666-667
Metil pentose, nas glicoproteínas, 139*t*
Metilação, 680-681
  na modificação covalente, aumentos de massa e, 31*t*
Metilação das bases de citosina, 710
5-Metilcitosina, 326, 326*f*
Metileno tetra-hidrofolato, 538-539
  na armadilha do folato, 538-539
7-Metilguanina, 326*f*
Metilhistidina na doença de Wilson, 299
Metilmalonicacidúria, 189
Metilmalonil-CoA, acúmulo de, na deficiência de vitamina B_{12}, 537
Metilmalonil-CoA isomerase (mutase), no metabolismo do propionato, 188*f*, 189, 189*f*, 537
Metilmalonil-CoA mutase (isomerase), 189, 189*f*, 537
Metilmalonil-CoA racemase, no metabolismo do propionato, 189, 189*f*
Metil-tetra-hidrofolato, na armadilha do folato, 538-539
Metionina, 19*t*, 299, 300*f*
  ativa (*S*-adenosilmetionina), 292, 292*f*, 299, 300, 300*f*, 327, 327*f*, 328*t*
  catabolismo da, 292, 292*f*, 293*f*
  na armadilha do folato, 537*f*
  necessidades para, 524
Metionina adenosiltransferase, 284*t*, 300, 300*f*
Metionina sintase, 537
Método de Sanger
  para o sequenciamento de polipeptídeos, 29-30
Método enzimático manual, 439-441
Método RTPCR, 441-442
Metotrexato, 338, 538-539
  di-hidrofolato/di-hidrofolato redutase afetado por, 338
Mevalonato, síntese do, 251, 252*f*
  na síntese do colesterol, 251*f*, 252*f*
Mg. *Ver* Magnésio
MI. *Ver* Infarto do miocárdio
Micelas, 462, 462*f*, 463
  lipídeos anfipáticos formando, 148, 149*f*, 462, 462*f*
  na absorção de lipídeos, 519
Micro (mi)RNAs, 352
Microalbuminúria, 723-724
Microarranjos, 681-682
Microbiologia, 1
Microfibrilas, 594
Microfilamentos, 627
β_2-Microglobulina, 643
Micronutrientes, 525. *Ver também* micronutrientes específicos
  vitaminas. *Ver* Vitaminas
Microtúbulos, 564-565, 626
  representação esquemática dos, 627*f*
Mieloma, 648
Mieloma múltiplo, 648
Mieloperoxidase, 664, 664*t*, 670-671*t*
  nos neutrófilos, 674, 674*f*
Migração celular, 594
Minerais, 3, 525-541
  digestão e absorção dos, 521
Mineralocorticoides, 483-485, 484-485*f*
Miocardiopatia dilatada, 620
Miocardiopatia hipertrófica familiar, 618-620
Miocardiopatias, 608, 618-619, 739-740
Miofibrilas, 609, 609*f*
Mioglobina
  catabolismo do heme da, 314
Mioglobina, 55
  curva de dissociação do oxigênio para, 50
  oxigênio armazenado por, 49
Mioglobinúria, 55
Miopatia,-partir de defeitos mitocondriais hereditários, 122
Miopatia mitocondrial infantil fatal e disfunção renal, 130
Mioquinase (adenilil-cinase), 113
  na regulação da gliconeogênese, 191
Miosina, 609, 612
  estrutura e função da, 609
  na contração muscular, 609-610, 612-616
Miotonia congênita, 618-619*t*
Miristilação
  na modificação covalente, aumentos de massa e, 31*t*
miRNA e pequena interferência (si), 352
MIT (monoiodotirosina), 490
MIT. *Ver* Monoiodotirosina
Mitocôndria
  apoptose na, 689-690
  cadeia respiratória na. *Ver* Cadeia respiratória
  ciclo do ácido cítrico na, 152, 153*f*, 155-156, 155*f*, 156*f*, 164, 168, 168*f*
  envolvimento no câncer, 713-715, 714-715*f*
  oxidação de ácidos graxos na, 207-208, 209-210*f*
  síntese de ALA na, 308, 309*f*
  síntese de proteínas e importação pela, 549*t*, 550
  transporte de íons na, 129
  transporte do fosfato de alta energia-partir da, 130, 131*f*
Mitocôndria humana, genes codificados por genoma da, 689*t*
ML. *Ver* Mucolipidoses
MOAT. *Ver* Transportador de ânion orgânico multispecífico
Modelamento, molecular, na análise da estrutura da proteína, 43
Modelamento molecular, na análise da estrutura de proteínas, 43
Modelo de ajuste induzido, 61, 61*f*
Modelo de chave e fechadura, 61
Modelo de ligação cruzada do filamento deslizante, da contração muscular, 609-610
Modelo do mosaico fluido, 465-466, 465*f*
Modificação covalente
  espectrometria de massa na detecção de, 31-33, 31*t*, 32*f*
  na maturação de proteínas, 45
  na regulação da catálise enzimática, 87, 89, 90*f*. *Ver também* Fosforilação, proteína; Proteólise
    fluxo de metabólitos e, 91
    irreversível, 89, 90*f*
    regulação da gliconeogênese e, 190
    reversível, 89, 90*f*, 91*t*
Modificação covalente da histona, 421
Modificações covalentes irreversíveis, 89, 90*f*
Modificações covalentes reversíveis, 90*f*, 91, 91*t*. *Ver também* Fosforilação, proteína
Modificações de histonas pós-traducionais, 710

Moléculas anfipáticas e dobramento, 9-10
Moléculas de adesão celular, 712, 712*t*
Moléculas de histocompatibilidade principal classe I, 561-562
Moléculas pequenas, 736
  desenvolvimento, 732
Moléculas pró-inflamatórias, 582
Moléculas quiméricas, 435-436, 450-451
  enzimas de restrição e DNA-ligase na preparação de, 439-440
Moléculas Rab, 563
Molibdênio, 541*t*
Monoacil glicerol aciltransferase, 230, 231*f*
2-Monoacilgliceróis, 231*f*
Monoiodotirosina, 490
Mononucleotídeo de flavina, 59, 116, 535
Mononucleotídeos, 324
  reações de recuperação e, 333*f*, 334
Mono-oxigenases, 118. *Ver também* Sistema do citocromo P450
Monossacarídeos, 133-134. *Ver também* tipo específico e Glicose
  absorção dos, 517, 518
  importância fisiológica dos, 134-135, 135*t*
Monóxido de carbono
  na cadeia respiratória, 127, 128*f*
  na fosforilação oxidativa, 122
  produzindo catabolismo do heme, 314
Montagem espontânea, 592
Mortalidade e envelhecimento, 685
Morte celular, 230, 233-234
Motivos de ligação do DNA e fatores de transcrição, 428-429*t*
Motivos de zíper de leucina, 429-430
Motivos hélice-alça-hélice, 38
Movimento de elétrons, no transporte ativo, 472
MPO (mieloperoxidase), 670-671*t*
MPO. *Ver* Mieloperoxidase
MPS. *Ver* Mucopolissacaridoses
mRNA. *Ver* RNA mensageiro
mRNA eucariótico, estrutura do, 433*f*
mRNA policistrônico, 413
MRP-2, na secreção de bilirrubina, 319
MstII, 435-436*t*
  na doença de célula falciforme, 445-446*f*
mtDNA. *Ver* DNA mitocondrial
Mucinas
  propriedades das, 574-575*t*
Mucinas ligadas à membrana, 573
Muco, 573
  representação esquemática do, 574-575*f*
Muco viscoso, 737
Mucolipidoses
  defeitos bioquímicos e testes diagnósticos, 599*t*
Mucopolissacarídeos, 138, 138*f*
Mucopolissacaridose
  causa da, 600-601*f*
  diagnóstico da, 600-601*t*
Mucopolissacaridose, 589, 600-601
  características da, 600-601*t*
  defeitos bioquímicos e testes diagnósticos, 599*t*
Mucoproteínas. *Ver* Glicoproteínas
Mudança de classe (isotipo), 647
Mudanças de estilo de vida, níveis de colesterol afetados por, 257-258
Mulher, necessidades de ferro da, 638
Músculo. *Ver também* Músculo cardíaco; Músculo esquelético
  ATP no, 608-609, 618-619
  catabolismo do, 748
  consumo de glicose no, 158
  contração do. *Ver* Contração muscular
  estriado, 609
  fibras no, 609*f*
  fosforilase no, controle do, 180
  glicogênio no, 178-179, 178-179*t*
  metabolismo, 154*f*, 155, 161*t*
    glicogênio, 178-180
    produção de lactato e, 173
  na transdução de energia, 608-610
  no estado de jejum, 160-161
  proteínas do. *Ver* Actina; Miosina; Titina
Músculo cardíaco, 614
Músculo esquelético, 611, 614, 624. *Ver também* Músculo; Contração muscular
  armazenamento de glicogênio nos, 624-625
  bioquímica, características da, 625*t*
  características dos, 624*t*
  glicogênio, fornecimento de, 623
  metabolismo no, 154*f*, 155
    produção de lactato e, 173-174
  reserva de proteína, 625-626
Músculo estriado, 610*f*, 614. *Ver também* Músculo cardíaco; Músculo esquelético
  interações de actina-miosina no, 621*t*
Músculo liso, 614
  contração do
    cálcio na, 620
    fosforilação da cadeia leve de miosina light na, 620
    regulação baseada na miosina da, 620
  interações actina-miosina no, 621
  relaxamento do
    cálcio no, 620
Mutação constitutiva, 413
Mutação do isocitrato desidrogenase (IDH), 714-715
Mutações, 54, 361-362, 364*f*, 554, 701*t*, 739-740
  afetando ciclinas e CDKs, 706
  constitutiva, 413
  conversão do gene e, 364, 732
  das proteínas de membrana, doenças causadas por, 475-477, 477*t*
  de troca (*missense*), 398, 399, 399*f*
    miocardiopatia hipertrófica familiar causada por, 618-620
    mudanças na sequência de nucleotídeos de mRNA causando, 401*f*
  deslocamento de fase, 400, 400*f*
  DNA mitocondrial (mt), 714-715
  espontâneas, 698-699
  integração e, 363-364, 363-364*f*
  isocitrato desidrogenase, 714-715
  mudanças na sequência de nucleotídeos de mRNA causando, 396, 396*f*, 400*f*
  pontuais, 401
  recombinação e, 362-364, 363-364*f*
  sem sentido, 400-401
  substituição de base, 398, 398*f*
  supressoras, 400
  transição, 398, 398*f*
  transposição e, 363-364
  transversão, 398, 398*f*
  trocas de cromátides-irmãs e, 364, 364*f*
Mutações de ponto, 398, 701
Mutações de transição, 398, 398*f*
Mutações de troca (*missense*), 399, 399*f*
  miocardiopatia hipertrófica familiar causada por, 618-620
Mutações espontâneas, 698-699
Mutações *frameshift*, 399-401
Mutações HFE, na hemocromatose, 637
Mutações sem sentido, 400
Mutações silenciosas, 398
Mutações supressoras, 400
Mutagênese, direcionada ao sítio, no estudo de enzimas, 68
Mutagênese direcionada ao sítio, no estudo de enzimas, 68
MYC (oncogene), 703*t*

N

Na. *Ver* Sódio
Na^+-K^+-ATPase, 473-474, 473-474*f*
  no transporte de glicose, 473-474, 473-474*f*
NaCl, grandes quantidades no suor, 736
NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo), 117, 530
  como coenzima, 117, 118*f*, 328*t*
  espectro de absorção do, 65, 65*f*
  no ciclo do ácido cítrico, 168
NADH
  espectro de absorção do, 65, 65*f*
  na regulação do piruvato-desidrogenase, 175, 176*f*
  oxidação de ácidos graxos produzindo, 209-210
  oxidação extramitocondrial do, transporte de substrato na, 129, 130*f*
NADH desidrogenase, 117
NADH-Q oxidorredutase, 122, 123, 123*f*
  como aceptor de elétrons, 122, 123*f*, 165*f*
$NADP^+$ (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), 117, 534*f*
  como coenzima, 117, 118*f*, 328*t*
  na via da pentose-fosfato, 197, 198*f*, 199*f*
NADPH
  nas reações no citocromo P450, 119*f*
  papel nos equivalentes de redução de suprimento nas células sanguíneas, 665
  para lipogênese, 219, 219-220*f*
  transidrogenase no, 129
  via da pentose-fosfato e, 197, 198*f*, 203
NADPH oxidase, 664, 664*t*, 670-671*t*
  componentes do, 673
  mutações nos genes para componentes do, 673, 674
  nas células fagocíticas em repouso, 673
NADPH-citocromo P450 redutase, 678-679
Nanotecnologia, 63
Não edematoso. *Ver* Marasmo
NDPs. *Ver* Difosfatos de ribonucleosídeo
Nebulina, 616
Necrose *versus* apoptose, 708
NEFA (ácidos graxos não estereficados). *Ver* Ácidos graxos livres
Neoplasia, 697-698
NESs. *Ver* Sinais de exportação nuclear
NeuAc. *Ver* Ácido N-acetilneuramínico
Neuraminidases, 571-572, 587
Neurônios, membranas dos
  canais de íons nos, 470*f*, 471*f*
  fusão da vesícula sináptica com, 565-566
  impulsos transmitidos ao longo, 473-474
Neuropatia, sensorial, no excesso de vitamina B_6, 536
Neuropatia sensorial, no excesso de vitamina B_6, 536
Neurotoxicidade, 732, 733*f*

Neutrófilos
adesão-células endoteliais, 672
ativação dos, 673
defesa do corpo contra infecção bacteriana, 672
enzimas e proteínas dos, 670-671, 670-671*t*
integrinas nos, 672, 672*t*
mieloperoxidase nos, 674, 674*f*
proteinases nos, 674-675, 674*t*
subfamílias nos, 672
Neutrófilos, transmigração dos, 583
Niacina, 536. *Ver também* Nicotinamida; deficiência de ácido nicotínico, 535
excesso/toxicidade da, 536
Nicotinamida, 530*t*, coenzimas derivadas da. *Ver também* Niacina
coenzimas derivadas da, 59
desidrogenases e, 117, 118*f*
excesso/toxicidade da, 535
Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+), 117, 535
como coenzima, 117, 118*f*, 328*t*
espectro de absorção da, 65, 65*f*
no ciclo do ácido cítrico, 166
Nicotinamida adenina dinucleotídeofosfato ($NADP^+$), 117, 535
como coenzima, 117, 118*f*, 328*t*
na via da pentose-fosfato, 197, 198*f*, 199*f*
NIDDM. *Ver* Diabetes melito não insulino-dependente
Níquel, 541*t*
Nitrogênio ureico no sangue
valores de referência para, 726*t*
Nitrogênio-α-amino. *Ver* Nitrogênio do aminoácido
Nitroglicerina, 622
Níveis séricos de tireoxina total, 725, 728
Nível do substrato, fosforilações no, 124*f*, 127
NLS. *Ver* Sinal de localização nuclear
NO. *Ver* Óxido nítrico
Nomenclatura, 562, 564
Norepinefrina, 488. *Ver também* Síntese de catecolaminas, 301, 304*f*
na termogênese, 247-248, 249*f*
Norepinefrina, biossíntese da, 489, 489*f*
Novos fármacos, abordagens para o desenvolvimento de, 681-683, 682-683*f*
NPCs. *Ver* Complexos de poros nucleares
NSAID. *Ver* Fármacos anti-inflamatórios não esteroidais
NSF. *Ver* Fator sensitivo NEM
Nuclease BAL 31, na tecnologia do DNA recombinante, 436-437*t*
Nuclease *dicer*, 394
Nuclease S1, na tecnologia do DNA recombinante, 436-437*t*
Nucleases, 10-11, 352
cromatina ativa e, 358
Núcleo da célula, importinas e exportinas no, 550*f*, 552
Núcleo esteroide, 146-147, 146*f*, 147*f*
Núcleo lipídico, de lipoproteínas, 239
Núcleo pentassacarídeo, 575*f*
Nucleófilo, água como, 10-11
Nucleoplasma, 553*f*
Nucleoproteínas, empacotamento de, 358, 359*f*, 359*t*
Nucleosidases (nucleosídeo fosforilases), purina, deficiência de, 338
Nucleosídeo difosfato quinase, 114
Nucleosídeos, 324-329, 325*t*
Nucleosídeos trifosfatos
análogos não hidrolisáveis dos, 328, 329*f*
na fosforilação, 114
na transferência do fosfato de alta energia, 114
transferência de grupo potencial dos, 327, 328*t*
Nucleossomos, 355, 356, 356*f*, 386
3′,5′-Nucleotídeo cíclico fosfodiesterase, na lipólise, 246-247
Nucleotídeos, 323-329, 325*t*, 396-401, 396*t*, 397, no mRNA. *Ver também* Purinas; Nucleotídeos pirimidinas/pirimidina
adenilil-quinase na interconversão de, 114
análogos sintéticos dos, na quimioterapia, 327-328, 329*f*
como ácidos polifuncionais, 326
como coenzimas, 328*t*
funções fisiológicas dos, 327
luz ultravioleta absorvida por, 326-327
metabolismo dos, 331-341
mutações causadas por mudanças nos, 398*f*, 399-400, 399*f*, 400*f*
polinucleotídeos, 328-329
Números variáveis de unidades repetidas em *tandem*, 573
na medicina forense, 446-447
Nutrição, 517-524. *Ver também* Dieta
lipogênese regulada por, 219-220
pesquisa bioquímica afetando, 3
Nutrigenômica, 4

O

Obesidade, 109, 151, 238, 517, 522
estudo de caso, 750-753
lipogênese e, 216-217
Obstrução biliar, hiperbilerrubinemia/icterícia causada por, 318, 319*t*
Octâmero de histona, 355, 355*f*, 356
Octâmeros, histona, 356, 356*f*
1,25$(OH)_2$-D_3. *Ver* Calcitriol (1,25$(OH)_2$-D_3)
Olho, frutose e sorbitol no, catarata do diabetes e, 205-206
Oligomerização, 732
Oligômeros, importados do, por peroxissomos, 552
Oligomicina, na oxidação e fosforilação, 127, 128*f*
Oligonucleotídeo
definição de, 451-452
na determinação da estrutura primária, 31
Oligossacarídeos, 132-133
estruturas dos, 575*f*
ligadas ao *O*, estruturas dos, 573*f*
ligados à membrana e à circulação, 575
OMP (orotidina monofosfato), 336, 337*f*
Oncogenes, 2, 736, 755*f*
ciclinas e, 371
crescimento celular dirigido para o câncer, 701*f*
definição, 701
e genes supressores do tumor, diferença entre, 703*t*
e perda de atividade dos genes supressores do tumor
mecanismos de ativação, 701, 701*t*
papel dos produtos de proteínas no desenvolvimento do câncer, 701-702, 702*f*
papel no desenvolvimento do câncer colorretal, 703, 704, 704*f*
propriedades dos, 703*t*
vírus do tumor, 702
Oncogenes virais. *Ver* Oncogenes
Oncoproteínas, proteína Rb e, 372
Oncovírus, ciclinas e, 371
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), banco de dados, 99
Operador direito, 416-420, 417*f*
Óperon lac, 413, 413*f*, 414*f*
OR. *Ver* Operador direito
ORC. *Ver* Complexo de reconhecimento de origem
ORE. *Ver* Elemento de origem da replicação
Organismos heterotróficos, 111
Ori (origem da replicação), 364-365, 366*f*, 450-451
Origem da replicação (ori), 364-365, 366*f*
Ornitina, 298
catabolismo da, 283, 285*f*
metabolismo da, 301*f*
na síntese da ureia, 276-278
Ornitina-δ–aminotransferase, 284*t*
Orotato fosforribosiltransferase, 337*f*, 338, 340
Orotidina monofosfato (OMP), 336, 337*f*
Orotidinúria, 340-341
Oscilação, 398
Osmolalidade, 739-740
valores de referência para, 727*t*
Osso
distúrbios metabólicos/genéticos, afetado por, 602-605
doenças metabólicas e genéticas, 604-605*t*
proteínas principais, 602-603*t*
tecido conectivo mineralizado, 601-604
Osso membranoso, 602-603*f*
Osteoartrite, 589, 601-602
Osteoblastos, 602-603*f*
Osteocalcina, 534
Osteoclastos, 602-603
na reabsorção óssea, 602-604*f*
Osteogênese imperfeita (ossos frágeis), 266, 602-604
Osteomalácia, 525, 754
Osteopenia, 754
Osteopetrose (doença do osso marmóreo), 604-605
Osteoporose, 531-532, 604-605, 755*f*
primária (pós-menopausa), estudo de caso, 753-755
Ouabaína, 136-137, 473-474
Na^+–K^+-ATPase afetados por, 473-474
Ovo branco, cru, deficiência de biotina causada por, 540
Oxalacetato
ciclo do ácido cítrico, 156*f*
na síntese de aspartato, 267, 267*f*
no catabolismo do esqueleto de carbono de aminoácidos, 282-283, 282-283*f*, 283
no ciclo do ácido cítrico, 156, 163, 164*f*, 166, 167*f*, 168
Oxidação, 115
ácidos graxos, 207-210. *Ver também* Cetogênese
acetil-CoA liberada e, 152, 153*f*, 208-210, 209-210*f*
aspectos clínicos dos, 214-215
hipoglicemia causada por deficiência dos, 214-215
na mitocôndria, 207-208, 209-210*f*
definição de, 115
desidrogenases na, 116-117, 118*f*
hidroperoxidases na, 117
oxidases na, 116, 116*f*, 118*f*

oxigenases na, 118, 119*f*
potencial redox e, 115, 116*t*
toxicidade do oxigênio e, 119-120
Oxidação biológica. *Ver* Oxidação
Oxidação catalisada por enzima de moléculas orgânicas por oxigênio molecular, 687
β-Oxidação de ácidos graxos, 208-210, 209-210*f*
modificada, 209-210*f*, 210
regulação da cetogênese e, 212-214, 213-214*f*
Oxidação mitocondrial de flavinas reduzidas, 545*f*
Oxidantes, 664
Oxidantes clorados
produção de, 674
Oxidases, 116-117, 116*f*. *Ver também* tipo específico
ceruloplasmina como, 640
cobre nas, 116
flavoproteínas como, 116-117, 116*f*
função mista, 118. *Ver também* Sistema do citocromo P450
Oxidases de função mistas, 118, 677-678. *Ver também* Sistema citocromo P450
Óxido nítrico, 608, 622-623, 623*t*, 659*t*
coagulação/trombose afetada por, 657, 659*t*
Óxido nítrico sintases, 622-623
reações catalisadas por, 298*f*
Óxidoesqualeno-lanosterol ciclase, 252, 253*f*
Oxidorredutase, 39, 122, 123*f*
NADH-Q, 122, 123*f*
como aceptor de elétrons, 122, 123*f*, 165*f*
Oxidorredutases, 58-59, 116. *Ver também* tipo específico
Oxiesteróis, 148
Oxigenação da hemoglobina
adaptação para alta altitude e, 54
hemoglobinas mutantes e, 54
mudanças conformacionais e, 51
apoproteínas, 51
2,3-bisfosfoglicerato estabilizando, 51*f*
Oxigenases, 115, 118-119
Oxigênio
afinidades de hemoglobinas (P50) para, 50
débito, 173
ligação, 50, 50*f*. *Ver também* Oxigenação
efeito Bohr e, 53, 53*f*
histidinas F8 e E7 no, 49, 49*f*
mioglobina no armazenamento do, 48-50
transporte do, ferro ferroso no, 48-50

P

P_{50}, afinidade da hemoglobina para o oxigênio e, 51
P53 (gene supressor do tumor), 704*t*
p97, 560-561
Pá, carregada, 471, 471*f*
PAF. *Ver* Fator de ativação plaquetário
Palíndromo, 452
Palmitato, 219
Palmitoilação, na modificação covalente, aumentos de massa e, 31*t*
Papaína, digestão de imunoglobulinas pela, 645
PAPS. *Ver* Adenosina 3′-fosfato-5′-fosfossulfato
Parada da tradução, 352
Parada de alongamento, 555
Paralisia periódica
hipercalêmica, 618-619*t*
hipocalêmica, 618-619*t*
Paralisia periódica hipercalêmica, 618-619*t*
Paralisia periódica hipocalêmica, 618-619*t*
Parâmetros da homeostasia do ferro, valores de referência para, 726*t*
Paratormônio, 491-492
biossíntese do, 491-492
em vesículas de armazenamento, 495
Pareamento de bases de Watson-Crick, 9-10, 344, 345*f*
Pareamento de bases no DNA, 9-10, 343-345, 345*f*
combinação para renaturação, 345-346
Partícula de reconhecimento do sinalizador, 556
Partículas de montagem, na pinocitose absortiva, 475
Partículas de ribonucleoproteína, 406-408, 433
Patologia, 1
Patologia molecular, 566-567
pBR322, 438-439*f*, 439-440
PCI. *Ver* Intervenção coronária percutânea
PCR. *Ver* Reação em cadeia da polimerase
PDGF. *Ver* Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDH. *Ver* Piruvato-desidrogenase
Pedras renais (cálculos de urato), 744
Pelagra, 525
Pele
deficiência de ácidos graxos afetando, 225-227
síntese de vitamina D_3 na, 531-532*f*
PEM (desnutrição proteína-energia)
primária, 748
secundária, 748
Penicilamina, para doença de Wilson, 641
Pentoses, 134-135, 135*t*
importância fisiológica da, 134-135, 135*t*
nas glicoproteínas, 139*t*
Pentosúria, essencial, 197, 204
Pentosúria alimentar, 204
Pentosúria essencial, 197, 204
PEPCK. *Ver* Fosfoenol piruvato-carboxiquinase
Pepsina, 519
na catálise acidobásica, 61
Pepsinogênio, 519
Peptidases, na degradação de proteínas, 272-273, 272-273*f*
Peptídeo A_1 da enterotoxina colérica V, 733
Peptídeo anormalmente dobrado na doença de Alzheimer, 732
Peptídeo β-amiloide, 730-731, 732*f*
agregação de, 732
Peptídeo sinalizador, 549, 555, 556
albumina, 632
na classificação de proteínas, 549*f*, 551, 551*f*, 555, 556*f*
nas proteínas destinadas para-membrana do aparelho de Golgi, 549
Peptídeos, 23, 482-483*f*. *Ver também* Aminoácidos
Peptídeos pequenos, apresentação, 561-562
Peptidil prolil-isomerase, 559-560
Peptidilglicina hidroxilase, vitamina C como coenzima para, 540
Peptidiltransferase, 404-405, 404-405*t*
Perda de proteína RB, 706
Perda muscular, 560-561, 748, 749*t*
Perfil, proteína, transcrito de RNA e, 452
Perfil de proteínas, transcrito do RNA e, 452
Perfil do transcrito, 447, 449
Perfil lipídico, valores de referência para, 726*t*
Perilipina, 246-248
Periósteo, 594
Permutação de cromátides-irmãs, 364
Permutação lítico/lisogênico
configuração da, 419*f*
Permutador de Ca^{2+}-Na^{+}, 618-619
Permutador de cálcio-sódio, 618-619
Peroxidação
de lipídeos insaturados, 688*f*
lipídeos, radicais livres produzidos pela, 147-148, 148*f*
Peroxidação lipídica, 687
Peroxidase antitireoide (antimicrossomal), anticorpos, 725, 728
Peroxidases, 117, 224-225
Peróxido de hidrogênio, 664, 689
como substrato de hidroperoxidase, 117
Peróxidos, 546
Peroxinas, 554
Peroxissomos, 118, 553
ausência/anormalidades dos, 554, 555*t*
na síndrome de Zellweger, 215, 554
biogênese dos, 554
na oxidação de ácidos graxos, 209-210
PFK-1. *Ver* Fosfofrutoquinase (fosfofrutoquinase-1)
PGH. *Ver* Projeto Genoma Humano
PGHS. *Ver* Prostaglandina H sintase
PGIs. *Ver* Prostaciclinas
PGs. *Ver* Prostaglandinas
pH, 11-14. *Ver também* Equilíbrio acidobásica
cálculo do, 11-12
carga resultante de aminoácidos e, 20-21, 21*f*
definição de, 11
isoelétrico, carga resultante de aminoácidos e, 20
tamponamento e, 13-14. *Ver também* Tampões
taxa de reação catalisada por enzima afetada por, 74-75
pH isoelétrico(pI), carga resultante de aminoácidos e, 20-21
PIC. *Ver* Complexo de pré-iniciação
PI-fosfolipase C (PI-PLC), 573*f*
Pinocitose, 473-474*f*
Pinocitose absortiva, 475
Pinocitose de fase fluida, 473-474*f*, 475, 475*f*
Pinos SNARE, 564-565
PIP_2 (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato), 145
na ativação plaquetária, 657, 658*f*
na pinocitose absortiva, 475
PIR.*Ver Protein Information Resourse*
Piridoxal fosfato, 59, 60, 536
na biossíntese da ureia, 274-275
na síntese do heme, 308
Piridoxina/piridoxal/piridoxamina (vitamina B_6), 536
deficiência de
excreção de xanturenato, 292, 292*f*
excesso/toxicidade de, 536-537
Pirimetamina, 538-539
Pirimidinas, 324
Pirimidinas/nucleotídeos de pirimidina, 324*f*, 326*f*
luz ultravioleta absorvida por, 326-327
metabolismo das, 331-341, 339*f*
doenças causadas pela superprodução do catabólito e, 340-341
metabólitos solúveis em água e, 339, 340-341*f*
não essencial na dieta, 332
precursores das, deficiência de, 340
síntese das, 324-327, 337*f*
catálise nas, 336
regulação das, 336, 338*f*
síntese de purina coordenada com, 338

Pirofosfatase, inorgânica
na ativação de ácidos graxos, 113, 208-209
na biossíntese do glicogênio, 178-179, 178-179*f*
Pirofosfato
energia livre da hidrólise de, 112*t*
inorgânico, 113-114
Pirrol, 48
Piruvato, 152
formação do, no catabolismo do esqueleto de aminoácido de carbono, 283*f*, 285, 287*f*
na gliconeogênese, 158
oxidação do, 166-167, 168*f*, 174-175, 175*f*, 176*f*, 177*t*. *Ver também* Acetil-CoA; Glicólise
aspectos clínicos da, 176
enzimas na, 190*t*
gliconeogênese e, 187, 188*f*
Piruvato-carboxilase, 166, 167*f*, 190*t*, 741
na regulação da gliconeogênese, 166, 167*f*, 187, 190*t*
Piruvato-desidrogenase, 167, 168, 168*f*, 175, 175*f*, 190*t*
deficiência de, 176
regulação do, 175, 176*f*
acetil-CoA no, 174-175
acil-CoA no, 176*f*, 222
tiamina difosfato como coenzima para, 534
Piruvato-quinase, 190*t*
deficiência de, 176, 665-666
na glicólise, 172*f*, 173, 190*t*
regulação e, 174-176
regulação da gliconeogênese e, 190
pK/pKa, 21
de ácidos fracos, 12-13, 20
de aminoácidos, 18*t*-19*t*, 20, 20*f*
ambiente afetando, 21-22, 21*t*
meio afetando, 14
PKA. *Ver* Proteinoquinase A
PKU. *Ver* Fenilcetonúria
Placa da íntima, 750
Placa viscosa na hemoglobina S, 54
Placas neuríticas, 731
Plaquetas
ativação/agregação das, 650, 657, 658*f*
aspirina afetando, 658-659
integrinas nas, 672, 672*t*
Plasma, 629
análise de enzimas no, 65
Plasma sanguíneo. *Ver* Plasma
Plasmalógenos, 145, 145*f*, 230, 232-233*f*
biossíntese dos, 232-233*f*
Plasmídeos, 437-438, 438-439*f*, 451-452
Plasmídeos bacterianos, 437-438
Plasmina, coágulos de fibrina dissolvidos por, 655-656, 656*f*
Plasminogênio, 656
ativadores do, 66, 656*f*, 659*t*
PLC (fosfolipase C)
ativação e interações hormônio-receptor, 506*f*
clivagem do PIP_2 por, 506*f*
Plecstrina, na ativação plaquetária, 658
PLP. *Ver* Piridoxal fosfato
pOH, no cálculo do pH, 11
Polaridade da síntese de proteínas, 401
Poliaminas, síntese das, 300, 301*f*
Poliânions, 600-601
Policitemia, 54
Polidistrofia pseudo-Hurler, 586
Polieletrólitos, peptídeos como, 23
Polimerases
DNA, 364-365, 366*f*, 367, 369
na tecnologia do DNA recombinante, 436-437*t*
RNA, dependente de DNA, na síntese de RNA, 379
Polimorfismos
comprimento do fragmento de restrição. *Ver* Restrição
DNA microssatélite, 446-447
microssatélite, 361-362
proteína plasmática, 631
Polimorfismos do comprimento do fragmento de restrição, 67, 445-446
Polimorfismos do DNA microssatélites, 361-362, 446-447, 451-452
Polimorfismos do nucleotídeo simples, 98, 443-445, 452
Polinucleotídeo quinase, na tecnologia do DNA recombinante, 436-437*t*
Polinucleotídeos, 328-329
modificação pós-translacional dos, 329
Polipeptídeos
sequenciamento dos
clivagem no, 30
determinação de Sanger dos, 29
síntese de proteínas nos, 26*f*
Pólipos adenomatosos, 735, 736
Polipose adenomatosa familiar, 735
Poliprenoides, 147, 148*f*
Polirribossomos, 350, 406-408, 549
hipótese do sinal de ligação dos, 550*f*, 555-557, 555*t*
síntese de proteínas nos, 549*f*, 550, 550*f*, 555
proteínas plasmáticas, 631
Polirribossomos ligados à membrana, 555
Polirribossomos livres, síntese de proteínas nos, 549, 558-559. *Ver também* Polirribossomos
Polisoprenoides, na síntese do colesterol, 252*f*, 253
Polissacarídeos, 132-133, 136-139, 138*f*. *Ver também* tipo específico
Polissomos. *Ver* Polirribossomos
POMC. *Ver* Família de peptídeos da pró-opiomelanocortina (POMC)
Pontes dissulfeto, dobras de proteínas e, 43
Pontes peptídicas, 23. *Ver também* Peptídeos
caráter de ligação dupla parcial das, 23, 23*f*
formação das, 10-11, 404-405
hidrólise das, 685-686
nas conformações secundárias, 36
Ponto de solubilidade, de aminoácidos, 21
Ponto ramificado, 178-179
por, 469
Porção hidrofílica da molécula de lipídeo, 148, 149*f*
Porção hidrofóbica da molécula de lipídeo, 148, 149*f*
Porfirias, 307, 312-314, 314*f*
achados principais nas, 313*t*
causas bioquímicas de sinais e sintomas de, 314*f*
Porfirinas, 307-320, 309*f*
espectro de absorção das, 311, 312*f*
espectrofotometria para detecção das, 311-312
reduzidas, 309
síntese do heme e, 308-309, 309*f*, 311*f*, 312*f*
Porfirinas de ferro, 307
Porfirinas reduzidas, 309
Porfirinogênios, 308
acúmulo na porfiria, 313
Porfobilinogênio, 308, 310*f*, 311*f*
Potássio, 541*t*, 739-740
coeficiente de permeabilidade do, 463*f*
no líquido extracelular e intracelular, 460, 460*t*
Potencial de transferência de grupo, 112
de nucleosídeo trifosfatos, 327, 328*t*
Potencial redox (oxidação-redução), 115, 116*t*
PPI. *Ver* Peptidil prolil-isomerase
PPi. *Ver* Pirofosfato
PR. *Ver* Progesterona
Pravastatina, 258-259
Pré-calicreína, 651*f*, 652
Precisão, testes laboratoriais (lab), 719-720
Precursores peptídicos
síntese hormonal-partir dos, 491
Prednisona, 739-740
Pregnenolona para testosterona, conversão da, 485, 487
Preparação enzimática pancreática, 736
Pré-pró-colágeno, 591
Pré-pró-hormônio, 491
Pré-pró-proteína, albumina sintetizada como, 632
Pré-pró-PTH, 491
Pré-proteínas, 549, 631
Pré-sequência. *Ver* Peptídeo sinalizador
Pré-sequências internas, 552
Pressão hidrostática, 631
Pressão oncótica (osmótica), 631
Pressão osmótica (oncótica), 631
Primaquina, 665
Primases, DNA, 366*f*
Primer do RNA, na síntese do DNA, 369*f*
pri-miRNAs. *Ver* Transcritos primários
Primossomo, 451-452
Príons, 44-45
Pró-acelerina (fator V), 652, 652*t*, 653*f*, 653*t*
Pró-albumina, 564-565
Pró-aminopeptidase, 519
Pró-caspases, 708
Procedimento de transferência *blot*, 439-440
Procedimento de transferência *Northern blot*, 346
Procedimento de transferência *Southern blot*, 346, 452
Procedimento de transferência *Southwestern blot*, 452
Processamento de oligossacarídeos, 549, 557, 580
aparelho de Golgi no, 557
via esquemática do, 578*f*
Processamento do RNA, alternativo, 432-433
Processamento nuclear de RNA, 431-432
Processamento nucleolítico, do RNA, 392
Processamento pós-traducional, 45-46, 408-409
no conjunto de membranas, 556
Processos estocásticos, mortalidade e envelhecimento como, 685
Processos não determinantes, mortalidade e envelhecimento como, 685
Pró-colágeno, 409, 540
Pró-colágeno aminoproteinase, 592
Pró-colágeno carboxiproteinase, 592
Pró-convertina (fator VII), 651, 651*f*, 652*t*, 653*t*
fármacos cumarínicos que afetam, 655
Produtos, 67
Produtos de íons, 11
Pró-elastase, 519
Pró-enzimas, 89-90
Pró-fármacos, 82, 677-678
transformação metabólica das, 82
Progesterona, 487-488*f*
Programas de acoplamento moleculares, 43, 101-103

Programas de dinâmica, molecular, 43
Pró-hormônios, 408
Pró-insulina, 491
  estrutura da, 492*f*
Projeção de Haworthn, 133-134, 133-134*f*
Projeto ENCODE, 98-99
Projeto Genoma humano, 4-5
  áreas de interesse atual, 4*f*
  implicações, 4
Prolil hidroxilase, 591
Prolina, 19*t*
  acúmulo de, 283, 284*t*, 285*f*
  catabolismo da, 283
  hidroxilação da, 591
  metabolismo da, 298*f*
  síntese da, 268, 268*f*
Prolina desidrogenase, 284*t*
Prolina desidrogenase, bloqueio de prolina catabolismo na, 283
Prolina hidroxilase, vitamina C como coenzima para, 540
Prolina-*cis*, *trans*-isomerase, dobra de proteína e, 44, 44*f*
Prolongamento de homopolímeros, 436-437
Promotor do tumor, 735
Promotores, na transcrição, 378-379, 380*f*
  eucarióticos, 383*f*
Promotores bacterianos, na transcrição, 380*f*
Promotores eucarióticos, na transcrição, 383
Pró-oxidantes, 546, 665. *Ver também* Radicais livres
Propionato
  glicose sanguínea e, 192
  metabolismo do, 187-189
  na gliconeogênese, 188*f*, 198
Propionil-CoA
  metionina na formação do, 292, 293*f*
  oxidação de ácidos graxos produzindo, 209-210
Propionil-CoA carboxilase, 189, 189*f*
Propriedades dos intensificadores, 424*t*
Pró-proteínas, 45, 89, 408, Proteases/proteinases
Pró-PTH, 491
Pró-quimiotripsina, ativação da, 89-90, 90*f*
Prostaciclinas, 142
  coagulação/trombose afetada por, 657, 658*f*, 659*t*
  significado clínico das, 226-227
Prostaglandina E2, 142, 142*f*
Prostaglandina H sintase, 224-225
Prostaglandinas, 142, 142*f*, 216-217, 224-225
  via da ciclo-oxigenase na síntese de, 224-226, 225-227*f*
Prostanoides, 142
  ia da ciclo-oxigenase na síntese dos, 224-226, 225-227*f*
  significado clínico dos, 226-227
Protamina, 655
Protease aspártica, família da, na catálise ácido-base, 61
Protease de processamento de matriz, 552
Proteases lisossomais, na degradação de proteínas, 560-561
Proteases/proteinases, 10-11, 519, 574-575. *Ver também* tipo específico
  clivando-sinaptobrevina, 565-566
  na degradação de proteínas, 272-273, 272-273*f*, 519
  renina, 57
Proteassomo, 557
  degradação no, 560-561
Proteassomos, proteínas dobradas com defeito (*misfolded*) nos, 560-561
  ubiquitinação nos, 560-562, 561-562*f*
Protein Information Resourse (PIR), 98
Proteína (lombar), valores de referência para, 727*t*
Proteína. *Ver também* proteínas específicas
  ciclo da vida da, 26*f*
  prenilação, 253-254
  translocação da, 26*f*
Proteína ancorada, 562, 564, 563*f*
Proteína ativadora do gene catabólito, 414
Proteína C, na coagulação do sangue, 653*t*, 655
Proteína C ativada
  resistência, 654
Proteína C ativada, na coagulação do sangue, 655
Proteína C ligada à miosina, 618-619
Proteína C reativa, 632, 632*t*, 719-720, 750
Proteína *Cro*, estrutura 3D da, 429-430*f*
Proteína da cadeia de translocação associada à membrana (TRAM), 555
Proteína de ligação ao CREB, 512
Proteína de ligação de ácidos graxos, 207-208, 240
Proteína de ligação de cadeia pesada de imunoglobulina, 596
Proteína de ligação de manose, 585
Proteína de ligação de retinol, 632*t*
Proteína de ligação do elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB), 504
Proteína de ligação TATA, 383
Proteína de membrana de passagem múltipla, 666-668
Proteína de Niemann-Pick tipo C 1, 258-259
Proteína de transferência do colesteril éster, 255-256, 255-256*f*, 257-258
Proteína de transporte de ácidos graxos de membrana, 239
Proteína de troca aniônica (banda 3), 666-667
Proteína direcionada poliubiquitinada, 560-561
Proteína dissulfito isomerase, dobra de proteína e, 43
Proteína do retinoblastoma, 371
Proteína fosfatase-1, 183*f*, 184*f*
  glicogênio fosforilase e, 182
Proteína Gla da matriz óssea, 530*t*
Proteína multirresistente-fármacos tipo 2 (MRP-2), na secreção de bilirrubinas, 316
Proteína p53, 706
Proteína p53/gene p53, 373-375
Proteína Rb. *Ver* Proteína do retinoblastoma
Proteína reguladora aguda esteroidogênica, 483-484
Proteína reguladora do AMP cíclico (proteína ativadora do gene catabólico), 414, 415
Proteína reguladora do catabólito, 503
Proteína relacionada à haptoglobina, 633-634
Proteína relacionada ao príon (PrP), 44, 45
Proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade, 239
  na captação de quilomicrons remanescentes, 240, 242, 243*f*
Proteína repressora cI/gene repressor cI, 417, 417*f*
Proteína repressora/gene, lambda (cI), 416-420, 416*f*-418*f*
Proteína S, na coagulação do sangue, 653*t*, 655
Proteína secretada, 555
Proteína TRAM (cadeia de translocação associada à membrana), 555
Proteína transportadora de ácidos graxos, membrana, 239-240
Proteína transportadora de acil, 217, 217*f*
  síntese de,-partir do ácido pantotênico, 217, 540
Proteínas. *Ver também* Peptídeos; tipo específico
  absorção de, 519
  aminoácidos nas, 18, 20, 22*f*
  aparelho de Golgi na glicosilação e classificação do, 549
  assimetria das, conjunto de membranas e, 565-566, 566-567*f*
  catabolismo das, 271-280
  classificação das, 36
  como polieletrólitos, 23
  configuração das, 35
  conformação das, 35
    ligações peptídicas afetando, 22
  de neutrófilos, 670-671, 670-671*t*
  degradação das, para aminoácidos, 272-273, 272-273*f*
  desconhecidas, identificação das, 100-102
  desnaturação das
    redobramento de proteínas e, 43
    temperatura e, 74-75
  dieta
    digestão e absorção das, 519
    metabolismo das, no estado alimentado, 160
    necessidades para, 524
  dimérica, 40
  direcionamento, para matriz, 549
  domínios das, 40, 41*f*
  estrutura das, 36-40
    análise das, 43
    cristalografia por raios X na análise das, 40
    dobras e, 43-44
    espectroscopia de ressonância magnética nas
    modelamento molecular e, 44
    ordens elevadas das, 35-46
    primária, 25-34, 36. *Ver também* Doenças de príons primárias associadas-alterações das, 44-45
    quaternárias, 36
    secundárias, 36-40
    supersecundárias, 38
    terciárias, 38
  fase aguda, 632, 632*t*
    negativa, vitamina-como, 528-529
  fibrosas, 45
    colágeno como, 45
  fosforilação das, 89, 90*f*, 91*t*. *Ver também* Fosforilação, proteínas
  funções das, bioinformática na identificação das, 33-34
  fusão, no estudo de enzimas, 67
  globulares, 36
  identificação, por homologia, 99-101
  importação das, pela mitocôndria, 550-552, 552*t*
  L-aminoácidos nas, 20
  modificação pós-traducional das, 45, 408
  monoméricas, 40
  nas membranas, 463-464, 471*t*. *Ver também* Glicoproteínas; Proteínas de membrana
    relação para lipídeos, 461*f*
  no líquido extracelular e intracelular, 460, 460*t*
  para relação lipídica na membrana, 460
  perda de, no trauma/infecção, 523-524
  princípios modulares na construção das, 36
  purificação de, 26-29
  reações com ROS, 688*f*

receptores como, 475
sequências ou moléculas direcionando, 549*t*
síntese das, 160, 395-410. *Ver também* Classificação de proteínas
alongamento nas, 401, 404-405*f*
ameaças ambientais afetando, 408
código genético/RNA e, 348-349, 348*t*, 396-397. *Ver também* Código genético
inibição de por antibióticos, 409, 409*f*
iniciação das, 401, 402*f*, 404-405*f*
no estado alimentado, 160
nos ribossomos, 156, 156*f*
pela mitocôndria, 549, 549*t*
polissomos na, 406-407, 549, 549*f*
princípios modulares na, 36
processamento pós-translacional e, 408
reconhecimento e ligação na, 38, 397*f*
terminação da, 405-406
translocação e, 404-405
vírus afetando, 408*f*
solúveis, 36
transcrição, 431-432*f*
transmembrana
canais de íons como, 469-471, 471*f*, 471*t*
Proteínas adaptadoras, na pinocitose absortiva, 475
Proteínas adicionais no músculo, 616
Proteínas agregadas
efeitos tóxicos de, 692
Proteínas apicais, 565-566
Proteínas associadas-microtúbulos, 626
Proteínas basolaterais, 564-565
Proteínas contendo KDEL, 549*t*, 558-559
Proteínas correguladoras de mamíferos, 513*t*
Proteínas da matriz, 550, 554
doenças causadas por defeitos na importação de, 554
Proteínas de choque de calor, como chaperonas, 44, 552
Proteínas de desacoplamento, 127
Proteínas de fase aguda, 524, 632, 632*t*
negativas, vitamina-como, 525, 528-529
Proteínas de fusão, recombinantes, no estudo de enzimas, 67
Proteínas de fusão recombinante, no estudo de enzimas, 67
Proteínas de ligação, 632*t*
Proteínas de ligação da fita simples de DNA, 366*f*
Proteínas de ligação de carboidratos, 572-573
Proteínas de ligação de intensificadores, 424
Proteínas de ligação do cálcio, vitamina K e carboxilação do glutamato e modificação pós-sintética e, 531-534
síntese e, 534*f*
Proteínas de membrana, 463-464, 471*t*, 554. *Ver também* Glicoproteínas
associação com-bicamada lipídica, 463
estrutura das, dinâmica, 463-464
integral, 36, 464, 465*f*
mutações afetando, doenças causadas por, 475-477, 477*t*
periféricas, 464, 465*f*
Proteínas de revestimento
função das, 562, 564
recrutamento das, 562, 564, 563*f*
Proteínas de transporte, 632*t*
Proteínas diméricas, 40
Proteínas do citoesqueleto periférico, 667-668*t*, 668-669
Proteínas do fator de fixação do NSF solúvel (SNAP), 564-566, 563*f*
Proteínas do receptor de man 6-P, 586
Proteínas dobradas com defeito (*misfolded*), acúmulo de, no retículo endoplasmático, 560-561
Proteínas efetoras Rab, 562, 564-565
Proteínas ferro-enxofre, nos complexos da cadeia respiratória, 122-123, 124*f*
Proteínas fibrosas, 45
Proteínas fosfatases, 90-92, 92*f*. *Ver também* Fosfatases
Proteínas G, 503*t*
classes e funções das, 503*t*
Proteínas globulares, 36
Proteínas heme, 307, 308*t*. *Ver também* Hemoglobina;
Proteínas integrais, 36, 464, 465*f*
como receptores, 475-476
da membrana das hemácias, 666-668, 667-668*f*, 667-668*t*
interação de proteínas do citoesqueleto com, 667-668*f*
Proteínas intermediárias e moléculas carregadas, 564-565
Proteínas ligadas ao GPI, 581
Proteínas lisossomais, 566-567
Proteínas monoméricas, 40
Proteínas não histona, 355
Proteínas normalmente inativas, 649
Proteínas nucleares, 573
Proteínas periféricas, 464, 465*f*
Proteínas plasmáticas, 568-569, 629-649, 632*t*. *Ver também* tipo específico e Glicoproteínas
concentração das, 635-636
eletroforese para análise das, 629, 630
funções das, 632, 632*t*
meia-vida das, 632
polimorfismo das, 631
síntese das
no fígado, 155, 631
nos polirribossomos, 631
transporte, 632*t*
Proteínas precursoras amiloides, 45, 731, 732*f*
na doença de Alzheimer, 45
Proteínas Rab, 562, 564
Proteínas Ran, 562, 564*t*, 564-565
Proteínas secretórias, 557
Proteínas SNARE, 561-565, 563*f*, 565-566
Proteínas solúveis, 557
Proteínas transativadoras, 423
Proteínas transmembrana, 65*f*
canais de íons como, 469-471, 471*f*, 471*t*
Proteínas t-SNARE, 562, 564-565
Proteínas v-SNARE, 561-566
Proteínas/moléculas de carga, 564-565
na exportação, 553
na importação, 552, 553*f*
Proteínas/sistemas carreadores, 468
Proteinases
de neutrófilos, 674-675, 674*t*
e ECM, 712
Proteinoquinase A, 503
Proteinoquinase C, 657, 657*f*
Proteinoquinase dependente de AMP cíclico, 41*f*. *Ver também* proteinoquinases
Proteinoquinase dependente de DNA, 373-375
Proteinoquinases, 89, 732, 733*f*
AMPc-dependente/AMPc-independente, 503
dependente de DNA, no reparo da quebra da fita dupla, 373-375
na fosforilação de proteínas, 90*f*, 91, 92*f*
na iniciação da síntese de proteínas, 401
na regulação hormonal da lipólise, 246-247, 247-248*f*
no metabolismo do glicogênio, 182-184, 183*f*, 184,184*f*
proteinoquinase C (PKC) na ativação plaquetária, 657, 657*f*
proteinoquinase-(PKA) e AMPc, 503
Proteinoquinases dependentes de ciclina, 371, 372*f*, 372*t*
inibição das, DNA/cromossomo integridade e, 373-375
Proteinúria, 723-724
Proteinúria de extravasamento, 724-725*t*
Proteinúria glomerular, 725, 728*t*
Proteinúria pós-renal, 724-725*t*
Proteinúria tubular, 724-725*t*
Proteoglicanos, 138, 568-569, 572-573, 595, 600-601, 605-606. *Ver também* Glicosaminoglicanos
funções dos, 601-602*t*
galactose na síntese dos, 203, 204*f*
heparano sulfato, 592
Proteólise, 565-566
na ativação da pró-quimiotripsina, 89-90, 90*f*
na modificação covalente, 89, 90*f*
Proteoma, 33
Proteoma de proteína plasmática humana, 631
Proteoma plasmático, 629
Proteômica, 4
meta da, 33
Prótons, transporte dos, pela hemoglobina, 48-55
Próton-translocação transidrogenase, 129
Proto-oncogenes, 701
ativação de inserção do promotor, 702*f*
Protoporfirina, 308, 309*f*
incorporação do ferro na, 309*f*
incorporação do ferro no heme, 309
Protoporfirina III, 308, 312*f*
Protoporfirinogênio III, 308, 312*f*
Protoporfirinogênio oxidase, 308, 311*f*, 312*f*, 313*t*
Protrombina (fator II), 652, 653*t*
ativação da, 652
fármacos cumarínicos que afetam, 655
na deficiência de vitamina K, 532
Proximidade, catálise pela, 60
PrP. *Ver* Proteína relacionada ao príon
PRPP glutamil amidotransferase
defeito, gota causada por, 338
na síntese de pirimidinas, 336, 337*f*
na síntese de purinas, 334-336, 335*f*
PSA. *Ver* Antígeno prostático específico
Pseudogenes, 364, 443-444
Pseudouridina, 340, 340-341*f*
Psicose de Korsakoff, 534
PstI, 435-436*t*
PTA. *Ver* Antecedente de tromboplastina plasmática
PTC. *Ver* Componente de tromboplastina plasmática
PTCA. *Ver* Angioplastia coronária transluminal percutânea
PTH. *Ver* Paratormônio
PTS. *Ver* Sequências direcionadas à matriz peroxissomal
PTS1 e PTS2, 554
PTSs. *Ver* Sequências direcionadas à matriz peroxissomal
PubMed, 96
Purificação, proteína/peptídeo, 26-29

Purinas/nucleotídeo de purina, 324-327, 324*f*, 326*f*
biossíntese das, 332, 332*f*-335*f*
catálise nas, 332, 333*f*
síntese de pirimidina coordenada com, 336
gota como, 338
luz ultravioleta absorvida por, 326-327
metabolismo das, 331-341
distúrbios das, 338-339
não essencial na dieta, 332
Puromicina, 409, 409*f*
Putrescina, na síntese de poliamina, 301*f*

Q

Q_{10} (coeficiente de temperatura), reações catalisadas por enzimas e, 74-75
Q-citocromo c-oxidorredutase, 122, 123*f*
Quenodesoxicolil-CoA, 256-257, 256-257*f*
Queratan sulfato I, 601-602
Queratinas, 627
Quilo, 240
Quilomícrons, 155, 160, 238, 238*t*
apolipoproteínas dos, 238*t*, 239
metabolismo dos, 155, 159*f*, 240-240, 242, 241*f*
no transporte do triacilglicerol, 240, 240*f*, 241*f*
Quilomícrons remanescentes, 238*t*, 239, 241*f*
captação hepática dos, 240, 242
Química combinatória, 64
Química sintética, 569-570
Quimioterapia do câncer
análogos dos nucleotídeos sintéticos na, 327-328, 328*f*, 329*f*
inibidores do folato na, 538-539
Quimioterapia para o tratamento do câncer
análogos de nucleotídeos sintéticos na, 327-328, 328*f*, 329*f*
inibidores de folato na, 538-539
Quimiotripsina, 519
na catálise covalente, 60-61
na digestão, 519
resíduos conservados e, 63*t*
Quimotripsinogênio, 519
Quinase A, proteínas de ancoragem, 503
Quinase de cadeia leve de miosina, 620, 621
Quinases, proteína. *Ver* Proteinoquinases
Quininogênio de alto peso molecular, 651*f*, 652, 653*f*
Quitina, 138, 138*f*

R

Radiação, reparo de excisão do nucleotídeo de DNA
dano causado por, 373-374, 373-374*t*
Radiação ionizante, reparo da excisão de nucleotídeos de dano de DNA causado por, 373-374, 373-374*t*
Radiação ultravioleta (UV), 690, 690*f*
carcinogenicidade, 699
Radial de Stokes, na cromatografia de exclusão por tamanho, 27
Radicais livres, 689. *Ver também* Antioxidantes
causando dano, 543
como reações em cadeia de autoperpetuação, 543
e teoria mitocondrial do envelhecimento, 689
fontes múltiplas de oxigênio, 545
hiperoxidases na proteção contra, 117
mecanismos de proteção contra o dano, 546
na toxicidade do oxigênio, 119-120
no *kwashiorkor*, 532
perioxidação lipídica produzindo, 147-148, 148*f*
Ramo citosólico para classificação de proteínas, 549, 549*f*, 550
Rancidez, peroxidação causando, 147
Raquitismo, 525
RAS (oncogene), 703*t*
Razão DIT:MIT, 490
Razões axiais, 36
RB (gene supressor de tumor), 704*t*
Reação acrossomal, 583
Reação da prolil hidroxilase, 269, 269*f*
Reação de Fenton, 664, 664*t*
Reação de geração de fluxo, 157
Reação de glutaminase, 276-277*f*
Reação de Haber–Weiss catalisada pelo, 664*t*, 665
Reação de Maillard, 581
Reação Edman, para sequenciamento peptídeo/proteína, 29, 30*f*
Reação em cadeia da polimerase, 67, 442-443*f*
na detecção da sequência de repetição microssatélite, 361-362
na determinação da estrutura primária, 30
Reação exergônica, 110
acoplamento e, 110
ATP na, 111
Reações Bi-Bi, 81-82
cinéticas Michaelis-Menten e, 81
Reações alérgicas, provocadas pela absorção de peptídeos, 517
Reações de conjugação, metabolismos xenobióticos, 678-679
acetilação, 680-681
conjugação com glutationa, 679-681
glicuronidação da bilirrubina, 679-680
metilação, 680-681
sulfatação, 679-680
Reações de descolamento duplo, 81
Reações de deslocamento
duplo, 81
sequencial (simples), 81
Reações de deslocamento sequencial, 81
Reações de deslocamentos simples, 81
Reações de recuperação
na síntese de pirimidina, 337-338
na síntese de purinas, 333*f*, 334, 335*f*
Reações de transferência de grupo, 10-11
Reações endergônicas, 110
acoplamento e, 110
ATP na, 111
Reações não equilibradas, 157
regulação da glicólise e, 174-176, 187-189
regulação do ciclo do ácido cítrico e, 168
Reações pingue-pongue, 81
Reagente de Sanger (1-fluoro-2,4-dinitro-benzeno), para o sequenciamento de polipeptídeos, 29
Reagente Edman (fenilisotiocianato), no sequenciamento de proteínas, 30, 30*f*
Rearranjos, DNA, 419*f*, recA
na diversidade de anticorpos, 646-647
recA, 418
Receptor B_1 varredor classe B, 242-243, 242-243*f*
Receptor cognato, 501
Receptor da asialoglicoproteína de mamíferos, 571-572
Receptor de di-hidropiridina, 614, 618-619
Receptor de ferritina, 635-636
Receptor de fibronectina, 594
Receptor de insulina, 480-481
Receptor de lipoproteína de muito baixa densidade, 239, 240
Receptor de rianodina, 614
doenças causadas por mutações no gene para, 614
Receptor de transferrina, 636
Receptor farnesoide X (FXR)
na regulação da síntese do ácido biliar, 257-258
Receptor varredor B_1, 242-243, 242-243*f*
Receptor X retinoide, 528-529
Receptores, 475. *Ver também* tipo específico
Receptores α-adrenérgicos, na glicogenólise, 182
Receptores acoplados à proteína G, 502, 502*f*
Receptores adrenérgicos, na glicogenólise, 182
Receptores com proteínas de transporte, comparação de, 495
Receptores do fator de crescimento do fibroblasto, 605-606
Receptores dos hormônios da tireoide, 480-481
Receptores esteroides, 480-481
Receptores hormonais
classificação, 480-481
especificidade e seletividade dos, 479, 479*f*
proteínas como, 480-481
reconhecimento e acoplamento nos, 479-481
Receptores hormonais peptídicos, 480-481
Receptores nucleares, 480-481
com ligantes especiais, 512*t*
Receptores para fragmentos de IgGs, 670-671*t*
Reciclagem, 564-565
Recombinação, cromossomal, 362-364, 363-364*f*
Recombinação cromossômica, 362-364, 363-364*f*
Reconhecimento celular, glicoesfingolipídeos no, 234-235
Reconhecimento específico do promotor, 379
Recursos genômicos, 97-98
Rede *trans* de Golgi, 549
Redução, definição de, 115
Região de junção, gene para, 646
Região Fab, 645
Região V/segmento. *Ver* Regiões/segmentos variáveis
Regiões codificadoras, 360, 360*f*
Regiões de controle do *locus*, 428-429
Regiões de determinação da complementariedade, 645
Regiões estruturais, 646
Regiões hipervariáveis, 645
Regiões não codificadoras, na tecnologia do DNA recombinante , 443-444
Regiões/segmentos constantes, 644
cadeia leve de imunoglobulina, 364-365
gene para, 646
Regiões/segmentos variáveis, 645-646
cadeia leve de imunoglobulina, 644, 646
cadeia pesada de imunoglobulina, 645
de imunoglobulinas, 646
gene para, 646
Regulação alostérica, da catálise enzimática, 87-88, 88*f*, 157*f*
regulação da gliconeogênese e, 190-191
Regulação de retroalimentação
na regulação alostérica, 88, 158
nos níveis de trombina circulante, 654
Regulação hormonal da lipólise, 246-247
Regulação hormonal de processos celulares, 504*f*
Regulador transmembrana da fibrose cística, 475-476, 736, 737, 737*t*, 738*f*, 738*t*
degradação do, 560-561

Reguladores negativos, da expressão do gene, 412, 412*t*, 418
Reguladores positivos, da expressão gênica, 412, 412*t*, 416, 418
Relação colesterol LDL:HDL, 257-258
Relação estrutura-atividade, 102-103
Relação glucagon/insulina, na regulação da cetogênese, 213-214
Relação insulina/glucagon , na regulação da cetogênese, 213-214
Remodelamento de cromatina, 710
Renaturação, DNA, pareamento dos pares de bases e, 345-346
Reparo da excisão de base do DNA, 373-374, 373-374*f*, 373-375*t*
Reparo de excisão do DNA do nucleotídeo, 373-374*f*, 756
Reparo de malpareamento do DNA, 373-374, 373-375s*f*, 373-375*t*
Replicação/síntese. *Ver* DNA; RNA
Repressão, enzima
  controle da síntese de enzimas e, 88
  na regulação da gliconeogênese, 190
Repressor *lac*, 414, 414*f*
Repressor lambda (*cI*) proteína/gene, 416-420, 416*f*, 417*f*
Repressores na expressão gênica, 412, 413
Reprodução, prostaglandinas na, 216-217
Reservatório, das proteínas de revestimento, 562, 564
Resíduos, peptídeo, 22
Resíduos catalíticos, conservados, 61*f*, 62-63
Resíduos conservados, 63
Resíduos de desoxicitidina, metilação da, 421
Resíduos de glicina, 591
Resíduos GlcNAc, 571-572
Resíduos NeuAc, 571-572
Resistência-medicamentos, 432-433
Respiração, aeróbia e ciclo do ácido cítrico, 163-164
Respiração, oxigênio para, 115
Resposta de proteína desdobrada, 559-560
Resposta imune, alternância de classe/isotipo e, 647
Resposta tipo A, na expressão gênica, 412, 412*f*
Resposta tipo B, na expressão gênica, 412-413, 412*f*
Resposta tipo C, na expressão gênica, 412*f*, 413
Retículo endoplasmático (RE), 406-407, 578. *Ver também* Estrogênios
  acúmulo de proteínas dobradas de modo inapropriado no, 559-560
  alongamento da cadeia de ácidos graxos no, 219, 221*f*
  hipótese do sinal da ligação de polirribossomos para, 550*f*, 555-557, 555*t*
  rugoso
    na classificação de proteínas, 555, 556*f*, 558-559*f*
    rotas de inserção de proteínas para, 555-556, 556*f*
    síntese de proteínas e, 406-407
  síntese do acilglicerol e, 156, 156*f*
Retículo endoplasmático rugoso
  ligação para, 550*f*, 555-557, 555*t*
  na classificação de proteínas, 549, 549*f*
  Ramo rugoso do ER, 555
  rotas de inserção de proteínas no, 550*f*, 555-557
  síntese de proteínas e, 406-407
Retículo sarcoplasmático, nível de cálcio no músculo esquelético e, 615
Reticulócitos e síntese de proteínas, 663, 664
Retina
  atrofia convoluta da, 283
  retinaldeído na, 526
Retinal. *Ver* Retinol
Retinaldeído, 526
Retinite pigmentosa, deficiência de ácidos graxos essenciais e, 223-224
Retinoides, 528-529. *Ver também* Retinol
Retinol, 528-529. *Ver também* Vitamina A
Retroposons/retrotransposons, 361-362
Retrotranslocação, 560-561
Retrovírus, transcriptases reversas nos, 348
Revolução genômica, 95-96
RFLPs. *Ver* Polimorfismos do comprimento do fragmento de restrição
RFs. *Ver* Fatores de liberação
Rianodina, 614
Riboflavina (vitamina B_2), 535
  coenzimas derivadas da, 59, 535
  desidrogenases dependentes de, 117
  no ciclo do ácido cítrico, 166
Ribonucleases, 352
Ribonucleosídeos, 324, 324*f*
Ribose, 132-133
  nos nucleosídeos, 324, 324*f*
  via da pentose-fosfato na produção de, 152, 199, 200
D-Ribose, 134-135*f*, 135*t*, 324, 328*f*
Ribose 5-fosfato, na síntese de purina, 332-335, 333*f*, 335*f*, 336*f*
Ribose 5-fosfato cetoisomerase, 199*f*, 200
Ribose fosfato, via da pentose-fosfato na produção de, 197, 198*f*
Ribossomopatias, 664
Ribossomos, 350, 351*t*
  bacterianos, 409
  síntese de proteínas, 26*f*, 156, 156*f*
    dissociação e, 401
Ribozimas, 68, 348
  catalisadores de enzimas, participação dos, 68
  Hipótese mundial do RNA, 68
  ribossomo, 68
D-Ribulose, 135*f*, 135*t*
Ribulose-5-fosfato-3-epimerase, 199*f*, 200
Ricina, 409
Rigor mortis, 613, 615
Rim
  glicogenólise no, 180
  membrana basal do, 601-602
  metabolismo da vitamina D no, 530
  metabolismo no, 161*t*
  no estado de jejum, 161
Ritmo diurno, na síntese do colesterol, 254
RM. *Ver* Espectroscopia de ressonância magnética (RM)
RNA, 343, 347-352, 378-379
  classes/espécies de, 349-352, 377-378
  complementaridade de, 348, 348*f*, 350
  estrutura do, 347-352, 348*f*, 350*f*, 351*f*
  heterogêneo nuclear (hnRNA), 352
  mensageiro (mRNA), 349, 349*f*, 350*f*, 377-378, 378-379*t*, 395
    atribuições dos códons no, 396*t*, 397
    sequência de nucleotídeos do, 396
    splicing alternativo e, 391
  micro (mi) e pequeno interferência (si), 352
  mutações causadas por alterações no, 398*f*, 399-400, 400*f*, 413, policistrônicas
    tecnologia do DNA recombinante e, 443-444
  na cromatina, 355
  na síntese de proteínas, 348-349, 349*t*
  pequeno, 351-352
  pequenos nucleares (snRNA), 349*t*, 351, 377-378, 378-379*t*, 452
  processamento do, 389
  relação ao DNA cromossômico, 360*f*
  ribossomal (rRNA), 350-351, 377-378, 378-379*t*
    como peptidiltransferase, 404-405, 404-405*t*
  silencioso, 450-451
  síntese do, 344, 377-379
    iniciação/alongamento/terminação no, 379
  splicing, 390-391
  transferência (tRNA), 349-350, 351*f*, 377-378, 378-379*t*, 397-398, 397*f*
    aminoacil, na síntese de proteínas, 403-404
    processamento e modificação do, 389
    região anticódon do, 396
    supressor, 400
RNA de transferência, 349-350, 377-378, 378-379*t*, 397-398, 397*f*. *Ver também* RNA
  aminoacil, na síntese de proteínas, 403-404
  processamento e modificação do, 393-394
  região anticódon do, 396
  supressor, 400-401
RNA mensageiro, 349, 349*f*, 350*f*, 377-378, 395, 403*f*, 433. *Ver também* RNA
  atribuições do códon de RNA no, 395, 396*t*
  edição do, 393
  exportador, 553
  modificação do, 393-394
  moléculas, 553
  policistrônico, 413
  ponto de início de transcrição e, 378-379
  relação ao DNA cromossomal, 360*f*
  sem tradução, 406-408
  sequência de nucleotídeos do, 396
    mutações causadas por mudanças no, 399-400, 400*f*
RNA nuclear pequeno, 349*t*, 351, 352, 377-378, 378-379*t*, 452
RNA pequeno, 351-352
RNA ribossomal, 350-351, 377-378. *Ver também* RNA
  como peptidiltransferase, 404-405, 404-405*t*
RNAP. *Ver* RNA-polimerases
RNA-polimerase dependente de DNA de bactérias, 379-380
RNA-polimerases, 419
  dependente de DNA, na síntese de RNA, 379
RNA-polimerases dependentes de DNA, 379
RNAs de interferência pequena (si), 352
RNase. *Ver* Ribonucleases
RNPs. *Ver* Partículas de ribonucleoproteínas
Rodopsina, 527, 531-532
ROS. *Ver* Espécies reativas de oxigênio
rRNA. *Ver* RNA ribossomal
RT-PCR, 452
RXR. *Ver* Receptor retinoide X
RYR. *Ver* Receptor de rianodina

S

S_{50}, 78
SAA. *Ver* Amiloide-sérica
Sacaropina, no catabolismo da lisina, 290, 290*f*
Sacaropina desidrogenase, 284*t*
Sacarose, 136-137, 137*f*, 137*t*
  índice glicêmico da, 518

S-adenosil-homocisteína-hidrolase, 284*t*
S-adenosilmetionina, 292, 292*f*, 299, 300*f*, 327, 327*f*, 328*t*
  biossíntese da, 300*f*
Sais (ácidos biliares), 255-258
  circulação êntero-hepática dos, 257-258
  na digestão e absorção de lipídeos, 519
  secundários, 256-257, 256-257*f*
  síntese dos, 255-258, 256-257*f*
    regulação dos, 256-257*f*, 257-258
sangue, funções de, 629, 630*t*
Sangue arterial, análise de gases
  valores de referência para, 275-276*t*
Sarcolema, 608, 739-740
Sarcômero, 609
Sarcoplasma, 609
Sarcosina (N-metilglicina), 302
SARs. *Ver* Relação estrutura-atividade
Saturação de transferrina, 745
  valores de referência para, 726*t*
Saúde, 1
  processos bioquímicos normais como base da, 2-5
SCID. *Ver* Doença de imunodeficiência combinada grave
Scrapie (tremor epizoótico), 45
SDS-PAGE. *Ver* Eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio
Sec12, 562, 564
Secreção constitutiva, 549
Secreção regulada, 549
Segmentos/regiões C. *Ver* Regiões constantes
L-selectina humana, esquema da, 583*f*
Selectinas, 583
Selênio, 541
  na glutationa peroxidase, 118, 201
Selenocisteína, síntese da, 270, 270*f*
Selenofosfato sintetase/sintase, 270, 270*f*
Seletividade/permeabilidade seletiva, membrana, 460-472, 466-472, 467*t*, 471*f*, 471*t*
Senescência replicativa, 694-695
Sensibilidade dos testes laboratoriais, 721-722
Sequência de iniciação, 384, 735
Sequência do sinalizador, 555, 564-565. *Ver também* Peptídeo sinalizador
Sequência líder. *Ver* Peptídeo sinalizado
Sequenciamento de proteínas
  biologia molecular no, 30
  clivagem de polipeptídeos e, 29
  espectrometria de massa no, 31, 31*t*, 32*f*
  genômica e, 33
  método de Sanger do, 29-30
  proteômica e, 33-34
  purificação de peptídeos para, 26-29
  purificação para, 26-29, 29*f*
  reação de Edman no, 29-30, 30*f*
Sequências de consenso, 388*t*, 390*f*
  Kozak, 403
Sequências de consenso de Kozak, 403
Sequências de inserção não clivadas, 558-559
Sequências de intervenção. *Ver* Íntrons (sequência de intervenção)
Sequências de repetição, intercaladas curtas, 361-362, 452
Sequências de repetição intercaladas curtas, 361-362, 452
Sequências de repetição intercaladas longas, 361-362
Sequências de replicação autônoma, 364-365, 450-451
Sequências direcionadas para matriz peroxissomal, 549*t*, 554, 554*f*
Sequências opogênicas, 558-559
Sequências repetidas microssatélite, 361-362, 451-452
Sequências repetitivas de DNA, 361-362
Serina, 18*t*, 22
  catabolismo da, formação do piruvato e, 285, 286*f*
  fosforilada, 301
  na síntese da glicina, 268, 268*f*
  na síntese de cisteína e homosserina, 269, 269*f*
  resíduos conservados e, 63
  síntese da, 267, 268*f*
  tetra-hidrofolato e, 537
Serina 195, na catálise covalente, 62
Serina hidroximetiltransferase, 285, 286*f*, 538-539
Serino proteases. *Ver também* tipo específico
  na catálise covalente, 62
  resíduos conservados e, 62, 63
  zimogênios das, na coagulação do sangue, 651, 653*t*
Serotonina, 300, 672*t*
  biossíntese e metabolismo da, 303*f*
Serpina, 641
SGLT 1 proteína transportadora, 518
SGOT. *Ver* Aspartato aminotransferase
SGPT. *Ver* Alanina aminotransferase
SHA. *Ver* Ácido suberoilanilida hidroxâmico
SHBG. *Ver* Globulina de ligação de hormônio sexual
Shoshin beriberi, 534
Sialil-Lewisx, 584*f*
Silenciamento por RNA, 452
Silicone, 541*t*
Sinais de exportação nuclear, 553
Sinais epigenéticos, transmissão e propagação dos, 424*f*
Sinais epigenéticos *cis*/*trans*, 422, 423*f*
Sinais intracelulares, 501
Sinais neurológicos, severos, 641
Sinal da manose 6-P, 578
Sinal de localização nuclear, 549*t*, 552, 553*f*
Sinal de transferência de parada, 557
Sinal de transferência Halt, 558-559
Sinalização transmembrana, 459, 475-476, 657
  na ativação plaquetária, 657, 658*f*
Sinalizador. *Ver também* Peptídeo sinalizador
  transmissão do, 460*t*. *Ver também* Transdução do sinalizador
Sinalizador de inserção transitório. *Ver* Peptídeo sinalizador
Sinalizador peptidase, 556, 556*f*
Sinalizadores de terminação, 396
  ou transcrição bacteriana, 386
Sinaptobrevina, 565-566
Síndrome 5*q*, 664
Síndrome carcinoide, 536
Síndrome cérebro-hepatorenal (Zellweger), 215, 554-555, 555*t*
Síndrome congênita do QT longo, 477*t*
Síndrome da hiperornitinemia-hiperamonemia, 283
Síndrome de Angelman, 272-273
Síndrome de Chèdiak-Higashi, 560-561*t*
Síndrome de Crigler-Najjar
  tipo I (icterícia não hemolítica congênita), 318
  tipo II, 318
Síndrome de Crigler-Najjar tipo I (icterícia não hemolítica congênita), 318
Síndrome de Dubin-Johnson, 319
Síndrome de Ehlers-Danlos, 46, 266, 589, 592
Síndrome de estresse porcino, 615
Síndrome de Gilbert, 318
Síndrome de Hermansky-Pudlak, 560-561*t*
Síndrome de Kartagener, 627
Síndrome de Lesch-Nyhan, 339, 743
Síndrome de Marfan, 593-594
Síndrome de Menkes, 265
Síndrome de Reye, acidúria orótica na, 340
Síndrome de Richner–Hanart, 287
Síndrome de Stickler, 605-606
Síndrome de von Hippel-Lindau, 272-273
Síndrome de Wernicke-Korsakoff, 530*t*
Síndrome de Williams–Beuren, 593
Síndrome de Zellweger (cérebro-hepatorrenal), 215, 554-555, 555*t*
Síndrome do estresse respiratório, deficiência de surfactante causando, 145, 234-235
Síndrome do Rotor, 319
Síndrome HHH. *Ver* Síndrome de hiperornitinemia, hiperamonemia e homocitrulinúria
Síndrome metabólica, 751
Síndrome oculocerebrorrenal, 560-561*t*
Síndrome pré-menstrual, vitamina B_6 na conduta na, neuropatia sensorial e, 536
Síndromes de Hurler, 600-601
Síndromes genéticas, 735
SINEs. *Ver* Sequências de repetição intercaladas curtas
Sintaxina, 565-566
Síntese da glicose, ácidos graxos e, 158
Síntese de ácidos graxos, carboidratos na, 158
Síntese de Fourier, 42
Síntese de proteínas
  aminoácidos na, 153, 153*f*
  nos ribossomos, 26*f*
  reticulócitos e, 663, 664
Síntese do cortisol, 484-485
Sinvastatina, 258-259
siRNAs, 351
Sistema ABO
  importância na transfusão sanguínea, 669-670
  substâncias ABO e, 669-670
Sistema cardiovascular, 593
Sistema carnitina, 128
Sistema da elongase de ácidos graxos, 219, 221*f*
  na síntese de ácidos graxos poli-insaturados, 223-224, 223-224*f*
Sistema de difusão/transporte facilitado, 467*t*, 468-469, 468*f*, 470*f*
  e transportadores, 468-469
  hormônios na regulação de, 469
  modelo Pingue-Pongue do, 469, 470*f*
  para bilirrubina, 315
  para glicose. *Ver também* Transportadores de glicose
    insulina afetando, 473-474
Sistema de elongase microssomal, 219, 221*f*
Sistema de numeração estereoquímico (-sn-), 144, 144*f*
Sistema de oxidação do etanol microssomal dependente do citocromo P450, 246
Sistema do citocromo P450, 115, 119, 119*f*, 558-559, 677-678
  ALA-sintase afetada por, 310, 314
  características principais do, 678-679*t*
  em formas polimórficas, 678-679
  indução do, 678-679
  indução enzimática e, 314

inserção da membrana, 557
interação de fármacos, 678-679
isoformas de, 677-679
lipídeos no, 678-679
no metabolismo de PAHs, 678-679
no retículo endoplasmático de fígados humanos, 677-679
nomenclatura para, 677-678
nos tecidos, 677-678
mitocondrial, 119
reações catalisadas por, 677-678
superfamília de enzimas contendo heme, 677-679
Sistema do hormônio receptor da proteína G efetora, 502, 502*f*
Sistema endócrino. *Ver também* Diversidade de hormônios do, 478-496
Regulação neural do, 478-479
Sistema esquelético, 593
Sistema extra mitocondrial, síntese dos ácidos graxos no, 216-217
Sistema Genevan, para nomenclatura de ácidos graxos, 141
Sistema heme-oxigenase, 314, 315*f*
Sistema imune, 749
Sistema nervoso
deficiência de tiamina afetando o, 534
glicose como necessidade metabólica para, 158
Sistema nervoso central, glicose como necessidade metabólica para, 158
Sistema portal hepática, 192
na circulação de metabólitos, 153, 155*f*
Sistemas cotransportadores, 469*f*
Sistemas de difusão de troca, 128
Sistemas isotérmicos, sistemas biológicos como, 109
Sistemas livres de células, vesículas estudadas nos, 562, 564
Sistemas simporte, 469
Sistemas uniportas, 468, 468*f*
Sítio Aceptor (A/aminoacil), ligação do aminoacil-tRNA, 403-404, 404-405*f*
Sítio alostérico, 88
Sítio ativo, 58-59. *Ver também* Sítios catalíticos
Sítio de entrada ribossomal interno, 408, 408*f*
Sítio de saída (E), na síntese de proteínas, 404-405, 404-405*f*
Sítio do promotor, no modelo do óperon, 413*f*, 414
Sítio E (saída), na síntese de proteínas, 404-405, 404-405*f*
Sítio *PstI*, inserção do DNA no, 438, 438*f*
Sítio-(aminoacil/aceptor), ligação do aminoacil-tRNA, 403-404, 404-405*f*
Sítios catalíticos, 87. *Ver também* Sítios ativos
Sítios *Cos*, 438-439
Sítios de contato, 552
Sítios hipersensíveis, cromatina, 357, 358
SK. *Ver* Estreptoquinase
SNAP (fator de fixação de NSF solúvel) proteínas, 563*f*, 564-566
SNAP 25, 565-566
α-SNAP, 564-565
SNP. *Ver* Polimorfismos do nucleotídeo simples
SNPs TAP, 87
snRNA. *Ver* RNA nuclear pequeno
Sobrecarga de ferro, 521
Sódio, 541
coeficiente de permeabilidade, 463*f*
no líquido extracelular e intracelular, 460, 460*t*
Solução de reidratação oral, 733
Soluções, aquosas, K_w das, 11
Solvente, água como, 7, 8-9*f*
Sondas de DNA no diagnóstico de porfiria, 313
Sono, prostaglandinas no, 216-217
Sorbitol
intolerância, 205-206
na catarata diabética, 205-206
Sorbitol desidrogenase, 201, 203*f*
SPCA. *Ver* Acelerador da conversão da protrombina sérica
Spliceossomo, 452
SR, 555, 555*t*
SR-B1. *Ver* Receptor varredor B_1
SRP. *Ver* Partícula de reconhecimento do sinalizador
SRS-A. *Ver* Substância de reação lenta da anafilaxia
SSBs. *Ver* Proteína de ligação da fita simples do DNA
ssDNA. *Ver* Fita simples do DNA
STAR. *Ver* Proteína reguladora aguda esteroidogênica
Substância de reação lenta da anafilaxia, 226-227
Substâncias do grupo sanguíneo H, 669-670, 669-670*f*
Substituição assimétrica, em porfirinas, 307, 309*f*
Substituição molecular, 42
Substituições de bases, mutações que ocorrem por, 398, 398*f*
Substratos, 61
alterações conformacionais nas enzimas causadas por, 61, 61*f*
concentração de, taxa de reação catalisada por enzima afetada por, 74-75
modelo de Hill, 76-78
modelo de Michaelis-Menten , 78
inibidores competitivos que se assemelham, 78
múltiplos, 74-75
subunidades β, 556
Substratos presos, 42
Subunidade β de SRP-R, 556
Subunidades A da endotoxina do cólera, 733
Subunidades β de hemoglobina e mioglobina, 55
Succinato, 164, 165*f*
Succinato semialdeído, 304, 305*f*
Succinato-desidrogenase, 117, 165*f*, 166
inibição da, 78
Succinato-Q-redutase, 122, 123, 123*f*
Succinato-tioquinase (succinil-CoA sintetase), 165*f*, 166
Succinil-CoA, na síntese do heme, 308, 310*f*, 312*f*
Succinil-CoA sintetase (succinato-tioquinase), 165*f*, 166
Succinil-CoA-acetoacetato-CoA transferase (tioforase), 166, 212-213
Sulfagalactosilceramida, 234-235
acúmulo de, 235
Sulfatação, 679-680
Sulfatídeo, 146
Sulfato, 570-571
ativo (adenosina 3′-fosfato-5′-fosfossulfato), 327, 327*f*
Sulfato ativo (adenosina 3′-fosfato-5′-fosfossulfato), 327*f*, 328
Sulfatos de esteroides, 234-235
Sulfito de hidrogênio, 128*f*
Sulfo(galacto)-glicerolipídeos, 234-235
Sulfonamidas, 665-667
Sulfotransferases, 597
Superfamília do receptor nuclear, 510, 511*f*
características estruturais, 511
Super-hélice orientada para-direita, 590
Super-helicoidais negativas, DNA, 346
Super-helicoidas, DNA, 346, 370-371, 372*f*
Superóxido, 119-120, 546, 664, 664*t*. *Ver também* Radicais livres
Superóxido dismutase, 119-120, 148, 664, 664*t*
Suprarrenal, esteroidogênese, 483-485, 487
síntese de androgênios, 484-485, 487, 484-485*f*
síntese de glicocorticoides, 484-485, 484-485*f*
síntese de mineralocorticoides, 483-485, 484-485*f*
vias envolvidas em, 484-485*f*
Suprarrenal, testes de função suprarrenal, 725, 728, 725, 728*t*
Surfactante, 229-230
deficiência de, 145, 234-235
Surfactante pulmonar, 229-230
deficiência de, 145, 234-235
Suscetibilidade genética, 739-740
Swainsonina, 580

T

*t*1/2. *Ver* Meia-vida
T3. *Ver* Tri-iodotironina
T4. *Ver* Tireoxina
TAFs. *Ver* Fatores associados à TBP
Talassemias, 55
α-Talassemias, 55, 661*t*
α-Talassemias, 661*t*
β-Talassemias, 55, 661*t*
β-Talassemias, 444-445, 661*t*
alterações estruturais de, 444-445*t*
Tamanho da inserção do DNA, 438-439*t*
Tamoxifeno, 715-716*t*
Tampões
ácidos fracos e seus sais como, 12
equação de Henderson-Hasselbalch descrevendo o comportamento de, 13
Tandem, 452
TaqI, 435-436*t*
TATA *box*, no controle da transcrição, 380, 383, 384, 386, 388
Taxa constante, 73-74
K_{eq} como razão de, 73-74
Taxa de renovação das células, 686*t*
Taxa de renovação de proteínas, 86-87, 271-273
membranas afetando, 565-567
taxa de degradação de enzimas e, 86-87
Taxa de reposição do epitélio intestinal, 686*t*
Taxa metabólica basal, 522
TBG (globulina de ligação de tireoxina), 495
TBG. *Ver* Globulina de ligação de tireoxina
TBP. *Ver* Proteína de ligação TATA
Tecido adiposo marrom, 247-249, 249*f*
Tecido gorduroso. *Ver* Tecido adiposo
Técnicas de transferência *blot*, 435-436
Tecnologia de microarranjo de alta densidade, 447, 449
Tecnologia genômica, 434-450. *Ver também* DNA recombinante/tecnologia do DNA recombinante
Telomerase, 358, 694-695
atividade nas células cancerosas, 706
Telômeros, 358, 359*f*
composição, 693-694
funções dos, 693-695
na replicação, 695-696*f*

Temperatura
no modelo do mosaico fluido da estrutura da membrana, 466
taxa de reação catalisada por enzima afetada por, 74-75
taxa de reação química afetada por, 71
Temperatura de fusão/temperatura de transição, 345, 465
Temperatura de transição/temperatura de fusão (Tm), 345, 465
Tempo de execução da espectrometria de massa, 31
Tempo de protrombina (PT), 722-723
Tempo de vida
evolução e, 695-696
versus longevidade, 685
Tempo de vida *versus* massa corporal para mamíferos, 694-695
Tensão, catálise por, 60
Teobromina, 326, 326*f*
Teofillina, 326, 327*f*
Teoria cinética (colisão), 72-73
Teoria da colisão (cinética), 72-73
Teoria das mutações somáticas do envelhecimento, 692
Teoria do envelhecimento do radical livre, 689
Teoria mitocondrial do envelhecimento e radicais livres, 689
Teoria quimiosmótica, 128
no controle respiratório, 126*f*, 128
Teoria quimiosmótica de Mitchell. *Ver* Teoria quimiosmótica
Teorias do envelhecimento do uso e abuso, 685-691
espécies de oxigênio reativo, 687-689, 687*f*, 688*f*
glicação de proteínas, 690, 691, 691*f*
mecanismos de reparo molecular e, 691-692
mitocôndria, 689-690
radiação ultravioleta, 690, 690*f*
radicais livres, 689
reações hidrolíticas, 685-687, 686*f*
Teorias metabólicas do envelhecimento, 693-694
Terapia de quelação, 745
Terapia gênica, 4, 446-447, 449, 566-567, 736, 738*t*, 757*t*
e nível de expressão, 730
para defeitos na biossíntese da ureia, 279-280
Terminação
cadeia, no ciclo de transcrição, 379
da síntese de proteínas, 405-407, 405-406*f*
da síntese de RNA, 378-379
Terminação da cadeia. *Ver também* Terminação, no ciclo de transcrição, 379*f*
Terminal transferase, 436-437*t*, 452
Termodinâmica
bioquímica (bioenergética), 109-112. *Ver também* ATP
glicólise reversível e, 187-189
leis da, 109-110
interações hidrofóbicas e, 9-10
Termogênese, 247-249, 249*f*
induzida por dieta, 247-248, 522-524, 753
Termogênese induzida pela dieta, 247-248, 522
Termogenina, 127, 249, 249*f*, 753
Teste da lise, multinuclearidade eritroblástica hereditária com, 584
Teste de Ames, 701*f*
Teste de estímulo com Synacthen, 725, 728
Teste diagnóstico. *Ver* Testes laboratoriais (lab)
Testes de depuração, 723-725
Testes de função da tireoide, 725, 728*t*
hormônio estimulador da tireoide, 724-725
níveis séricos de tiroxina total, 725, 728
Testes de função dos órgãos
testes de função hepática, 722-723, 723-724*t*
testes de função renal, 722-724, 723-724*t*
Testes de função renal, 722-724, 723-724*t*
Testes de função renal, valores de referência para, 726*t*
Testes diagnósticos moleculares, 4
Testes genéticos, 745
Testes laboratoriais (lab)
automação dos, 722-723
avaliação da validade, 721-722
causas de anormalidades nos níveis dos analitos mensurados nos, 719-720, 719-721*t*
importância na medicina clínica, 719-720
interpretação dos, 722-723
testes bioquímicos. *Ver* Testes laboratoriais bioquímicos
testes de função de órgãos, 722-725, 728, 723-725*t*, 725, 728*t*
usos dos, 722-723
validade do resultado, 719-721
valor preditivo dos, 721-722
variáveis que afetam os valores dos, 721-722
Testes laboratoriais bioquímicos. *Ver também* Testes de laboratório (lab)
usos de, 719-721
valores de referência para, 726-727*t*
Testosterona, 481-482
metabolismo, 485, 487
produtos metabólicos da, 485, 487
via de biossíntese, 486*f*
Tetraciclina, 438-439
Tetra-hidrobiopoterina, 269*f*
Tetra-hidrofolato, 538-539
Tetraiodotironina (tireoxina; T4), 489-491
armazenamento do, 495*t*
no plasma, 496*t*
síntese, 489
Tetrâmero de histona, 355, 356
Tetrâmeros
hemoglobina como, 50
histona, 355-356
Tetroses, 132-133, 133-134*t*
Tf. *Ver* Transferrina
TFIIA, 386
TFIIB, 386
TFIID, 386-388
TFIIE, 384, 386
TFIIF, 386
TFPI. *Ver* Inibidor da via do fator tissular
TfR. *Ver* Receptor de transferrina
TGN. *Ver* Rede *trans* Golgi
Tiamina (vitamina B_1), 525
coenzimas derivadas do, 59
metabolismo do piruvato afetado por, 174, 176, 534
no ciclo do ácido cítrico, 166
Tiamina difosfato, 174, 200, 534
Tiamina pirofosfato, 59
Tiamina trifosfato, 534
Tiglil-CoA, catabolismo da, 295*f*
TIM. *Ver* Translocase da membrana interna
Timidilato, 343
Timidina, 325*t*
pareamento de bases no DNA, 344, 345*f*
Timidina monofosfato (TMP), 325*t*
Timina, 325*t*
Tioesterase, 217, 217*f*, 219
Tioforase (succinil-CoA-acetoacetato-CoA--transferase), 166, 212-213
6-Tioguanina, 328, 328*f*
Tiolase, 209-210, 209-210*f*, 212-213
na síntese do mevalonato, 251, 251*f*
Tioquinase (acil-CoA sintetase)
na ativação de ácidos graxos, 208-209, 209-210*f*
na síntese do triacilglicerol, 230, 246*f*, 249
Tiorredoxina, 336
Tiorredoxina redutase, 336, 336*f*
Tipo sanguíneo, 669-670
Tiras "reativas" descartáveis, 723-724
Tireoxina,valores de referência para, 727*t*
Tiroglobulina, 490
Tirosina, 18*t*, 20, 301, 304*f*, 481-482
catabolismo da, 287-288, 289*f*
epinefrina e norepinefrina formadas-partir da, 304*f*
fosforilada, 301
na hemoglobina M, 54
necessidades de, 524
síntese da, 269, 269*f*
síntese de hormônios-partir da, 488-489
Tirosina aminotransferase, 284*t*
defeito na tirosinemia, 287
Tirosina hidroxilase na biossíntese de catecolaminas, 489
Tirosinemia, 287
Tirosinemia neonatal, 287
Tirosinose, 287
Titina, 616
Tm. *Ver* Temperatura de fusão / temperatura de transição
TMP (timidina monofosfato), 325*t*, 326*f*
Tocoferol, 530*t*. *Ver também* Vitamina E
α-tocoferol, 546
como antioxidante, 119-120, 148, 531-532
Tocotrienol, 532. *Ver também* Vitamina E
Tofos, 743
Tolbutamida, 214-215
Tolerância à glicose, 195, 195*f*
TOM. *Ver* Translocase da membrana externa
Topoisomerases, DNA, 346, 370-371, 371*f*, 371*t*
Toxemia gravídica em ovelhas
cetose na, 215
esteatose hepática e, 243-244
Toxicidade, vitamina, 525
Toxicidade do oxigênio, radical livre superóxido e, 119-120. *Ver também* Radicais livres
Toxicologia, 1
Toxicose pelo cobre, 641. *Ver também* Doença de Wilson
Toxina B do botulismo, 565-566
Toxina diftérica, 409, 472
Toxinas, microbianas, 472
Toxinas microbianas, 472
t-PA. *Ver* Ativador do plasminogênio tecidual
TpC. *Ver* Troponina C
TpI. *Ver* Troponina I
TpT. *Ver* Troponina T
Tradução, 396
Tradução com cadeia de quebra, 452
Tráfico intracelular, 548-567. *Ver também* Classificação de proteínas
distúrbios devido-mutações na codificação de genes, 555*t*, 566-567
no transporte de vesículas, 561-566

Transaldolase, 200
Transaminação, 153, 153*f*
na biossíntese da ureia, 273-274*f*, 274-275
no catabolismo do esqueleto de carbono de aminoácidos, 282-283, 282-283*f*
no ciclo do ácido cítrico, 166, 167*f*
Transaminase glutâmica pirúvica sérica
Transaminases. *Ver* Aminotransferases
Transcitose, 564-565
Transcortina. *Ver* Globulina de ligação aos corticosteroides
Transcrição, 346, 386-388, 447, 449
ácido retinoico na regulação da, 528-529
ativadores e coativadores no controle da, 388
iniciação da, 379
na regulação da expressão do gene, 416-420. *Ver também* Expressão gênica
na síntese do RNA, 344, 378-379
promotores bacterianos na, 382
promotores eucarióticos na, 383-385
reversa
nos retrovírus, 348, 370-371
Transcrição de células eucarióticas, expressão gênica na, 429-431*t*
Transcriptase reversa/transcrição reversa, 348, 364, 452
na tecnologia do DNA recombinante, 436-437*t*
Transcriptômicos, 4
Transcrito de RNA, e perfil de proteínas, 452
Transcritos primários, 379, 392, 393
Transdução do sinalizador
mensageiro intracelular no. *Ver também* tipo específico
na ativação plaquetária, 657, 658*f*
Transfecção do DNA, endocitose na, 473-474
Transferases, 58-59
Transferência de energia, 112
Transferrina, 521, 632*t*, 633-636, 638
Transfusão sanguínea, importância do sistema ABO na, 669-670
Transglutaminase, na coagulação do sangue, 651, 653*t*, 654*f*
Transição mesenquimal epitelial, 712
Transidrogenase, translocação de prótons, 129
Translocação
para o lúmen, 555
proteína, 26*f*, 551
Translocação cromossômica, 701, 701*t*
Translocação pós-traducional, 556
Translocador, 556
Translocase da membrana externa, 551
Translocase da membrana interna, 551
Transplante de medula óssea, 730
Transportador de ânion orgânico multispecífico, 316
Transportador de cetoglutarato, 129, 130*f*
Transportador de fosfato, 129, 129*f*
Transportador de metal divalente, 638
Transportador do nucleotídeo adenina, 128*f*, 129
Transportadores cassete com ligação de ATP-1, 242-243, 242-243*f*
Transportadores de glicose, 193, 663, 664*t*
insulina afetando, 473-474
na regulação da glicose sanguínea, 193, 194, 247-248
Transportadores de glutamato/aspartato, 129, 130*f*
Transportadores de troca, 128-130, 131*f*
Transportadores/sistemas de transporte, 463, 557. *Ver também* tipo específico
ativos, 467, 467*t*, 468, 468*f*
cassete de ligação de ATP, 242-243, 242-243*f*
codificação de genes, 555*t*, 566-567
comparação com canais de íons, 469*t*
difusão facilitada, 467*t*, 468, 468*f*, 469, 470*f*
difusão facilitada envolvendo, 468-469
difusão passiva envolvendo, 467-468
glicose. *Ver* Transportadores de membrana de glicose, 468
na inserção cotranslacional, 557, 557*f*
transporte ativo envolvendo, 468-469
Transporte anterógrado (COPII), 561-562, 563*f*
Transporte ativo, 467, 467*t*, 468, 468*f*, 469*f*, 469*t*
na secreção de bilirrubina, 316, 316*f*
Transporte de colesterol reverso, 242-243, 242-243*f*, 251, 255*f*, 257-258
Transporte de creatinofosfato, 129, 131*f*
Transporte de membrana, 467*t*, 468, 468*f*-471*f*. *Ver também* mecanismos específicos
Transporte de substratos, 129, 129*f*, 130*f*
coenzimas como, 59
Transporte do glicerolfosfato, 129, 130*f*
Transporte do malato, 129, 130*f*
Transporte retrógrado, 558-559, 561-562
a partir do aparelho de Golgi, 558-559
de proteínas dobradas de modo inapropriado, 559-560
Transposição, 363-364
retroposons/retrotransposons e, 361-362
Transposição cromossômica, 363-364
Transquetolase, 198, 199*f*
eritrócitos, na avaliação do estado nutricional de tiamina, 534-535
tiamina difosfato em reações envolvendo, 198, 200, 534
Transtirretina, 643
assimetria transversa, 565-566
movimento transverso, de lipídeos por meio da membrana, 464
mutações transversas, 398, 398*f*
Trastuzumabe, 715-716*t*
Tratamento intravenoso, para cólera, 733
Tratamento sintomático, 739-740
Trato genital, 737
Tratos respiratório e gastrintestinal, 736
Trauma, perda de proteína e, 523-524
Trealase, 518
Trealose, 137*t*
Treonina, 18*t*
catabolismo da, 286
fosforilada, 301
necessidades para, 524
TRH. *Ver* Hormônio de liberação de tireotropina
Triacilgliceróis (triglicerídeos), 144, 144*f*, 238, 246-248
digestão e absorção dos, 518, 519
interconvertabilidade dos, 158
metabolismo dos, 152, 153*f*, 155, 155*f*
esteatose hepática e, 243-245, 244-245*f*
hepáticos, 243-244
hidrólise nos, 229-230
lipoproteínas de alta densidade nos, 240, 242-244, 242-243*f*
no tecido adiposo, 246-247, 246*f*
no centro da lipoproteína, 239, 239*f*
no tecido adiposo, 151
redução dos níveis séricos dos, fármacos para, 257-259
síntese dos, 229-230, 231*f*
transporte dos, 240, 240*f*, 241*f*
Triagem automatizada, 64
Trifosfatos, nucleosídeos, 324, 325*f*
Triglicerídeos (jejum), valores de referência para, 726*t*
Triglicerídeos. *Ver* Triacilgliceróis (triglicerídeos)
Tri-iodotironina (T_3), 489-491
armazenamento da, 495*t*
no plasma, 496*t*
síntese, 489
Trimetoprim, 538-539
Trioquinase, 201, 203*f*
Triose fosfato isomerase, 39*f*
Triose fosfatos, acilação dos, 152
Trioses, 132-133, 133-134*t*
Tripsina, 62, 519
na digestão, 519
resíduos conservados e, 63*t*
Tripsinogênio, 519
Triptofano, 19*t*, 300, 526
catabolismo do, 290-292, 291*f*
coeficiente de permeabilidade do, 463*f*
deficiência de, 535
necessidades de, 524
niacina sintetizada-partir do, 535
Triptofano-oxigenase/L-triptofano-oxigenase (triptofano-pirolase), 118, 291*f*, 292
L-Triptofano-dioxigenase (triptofano pirrolase), 118
Trissacarídeo Gal-Gal-Xyl-Ser, 572-573
tRNA. *Ver* RNA de transferência
tRNA supressor, 400-401
Trombina, 651, 651*f*, 654*f*
a partir da protrombina, ativação do fator Xa, 652, 653
antitrombina III afetando, 655
controlando os níveis circulantes de, 654
formação da fibrina e, 653-654, 654*f*
na ativação plaquetária, 657, 658*f*
resíduos conservados e, 63*t*
Trombo, 750, 750*f*
Trombo branco, 650
Trombo vermelho, 650
Trombólise
testes laboratoriais na avaliação da, 659
t-PA e estreptoquinase na, 656, 656*f*
Trombomodulina, na coagulação do sangue, 653*t*, 655, 659*t*
Trombopoetina, 661
Trombose, 650-659. *Ver também* Coagulação (sangue)
antitrombina III na prevenção de, 655
fases da, 650
hiper-homocisteinemia e, suplementos de ácido fólico na prevenção de, 538-539
na deficiência de proteína C ou proteína S, 655
níveis de trombina circulante e, 654
produtos da célula endotelial na, 657, 659*t*
tipos de trombos e, 650
t-PA e estreptoquinase no manejo da, 656, 656*f*
Trombose coronariana, 750
Tromboxano A_2
na ativação plaquetária, 657, 658*f*
Tromboxano A_2, 143*f*
Tromboxanos, 142, 143*f*, 216-217, 224-225
via da ciclo-oxigenase na formação dos, 224-225, 225-226*f*
Tropocolágeno, 45

Tropoelastina, 593
Tropomiosina, 609, 611, 613, 667-668*t*
como inibidor do músculo estriado, 614
Troponina, no diagnóstico do infarto do miocárdio, 66
Troponina C, 613
Troponina I, 613
Troponina T, 613, 750
valores de referência para, 727*t*
Troponina/complexo de troponina, 609, 611*f*, 613-614
como inibidor do músculo estriado, 614
Troponinas cardíacas, 66
TSEs. *Ver* Encefalopatias espongiformes transmissíveis
TSH, 747. *Ver também* Hormônio estimulador da tireoide
α-Tubulina, 626
β-Tubulina, 626
γ–Tubulina, 626
Tumor benigno, 735
Tumores, 697-698
imunologia dos, 715-716
pH e tensão de oxigênio nos, 713-714
Tunicamicina, 580-581
TXs. *Ver* Tromboxanos

U

Ubiquinona (Q/coenzima Q), 147
na cadeia respiratória, 122, 123*f*, 124*f*
na síntese do colesterol, 252*f*, 253
Ubiquitina e degradação de proteínas, 272-273, 272-273*f*, 560-566, 561-562*f*
Ubiquitinação, 26*f*
de proteínas dobradas com defeito (*misfolded*), 560-561, 561-562*f*
Ubiquitinação, 272-273
UDPGal. *Ver* Uridina difosfato galactose
UDPGlc. *Ver* Uridina difosfato glicose
UDP-Glc pirofosforilase, 571-572*f*
UDP-glicose. *Ver* Uridina difosfato glicose
UFA (ácidos graxos não esterificados). *Ver* Ácidos graxos livres
Úlceras, 517
Úlceras pépticas, 587
UMP (uridina monofosfato), 325*t*, 326*f*
Unidade de transcrição, 378-379
Unidade de transcrição de resposta hormonal, 510*f*
Unidades de isoprene, poliprenoides sintetizados--partir de, 147, 148*f*
Unidades SI (Sistema Internacional de Unidades), 729
UniProt, 97-98
Uracila, 325*t*
Uracilúria-timinúria, 331, 340
Urato, como antioxidante, 148
Ureia, 738
catabolismo do nitrogênio produzindo, 276-279
coeficiente de permeabilidade da, 463*f*
metabolismo de aminoácidos e, 153, 154*f*
síntese da, 273-274*f*, 274-275, 274-275*f*
distúrbios metabólicos associadas a, 278-280
terapia gênica para, 279-280
Ureia sérica como marcador da função renal, 723-724
Uridina, 324*f*, 325*t*
Uridina difosfato galactose, 201-202, 571-572
Uridina difosfato glicose (UDP-Glc), 178-179, 178-179*f*, 570-571
na biossíntese do glicogênio, 178-179, 178-179*f*
Uridina difosfato glicose desidrogenase, 201-202*f*
Uridina difosfato glicose pirofosforilase, 201, 201-202*f*
na biossíntese do glicogênio, 178-179, 178-179*f*
Uridina difosfatogalactose (UDPGal) 4-epimerase, 201-202, 204*f*
Uridina difosfato-glucuronato/ácido glucurônico, 201, 201-202*f*
Uridina monofosfato (UMP), 325*t*, 326*f*
Uridina trifosfato (UTP), na biossíntese do glicogênio, 178-179, 178-179*f*
Urina, 739-740
constituintes anormais da, 724-725, 724-725*t*
Urobilinogênios
bilirrubina conjugada reduzida para, 316-317
na icterícia, 319, 319*t*
valores normais para, 319*t*
Uroporfirinas, 309*f*
espectrofotometria para detecção de, 311-312
Uroporfirinogênio descarboxilase, 308, 310*f*-312*f*, 313*t*
na porfiria, 313*t*
Uroporfirinogênio I, 308, 311*f*, 312*f*
Uroporfirinogênio I sintase, na porfiria, 313*t*
Uroporfirinogênio III, 308, 311*f*, 312*f*
Uroquinase, 656, 656*f*
Uso de tabelas de códons, 396
UTP, na fosforilação, 114

V

Valina, 18*t*, 21
catabolismo da, 293, 294*f*, 295*f*
interconversão da, 269
necessidades de, 524
Valinomicina, 129
Valores de referência, 729
Vanádio, 541*t*
Vantagem seletiva para o crescimento, 730
Varfarina, 532, 533, 655, 678-679
vitamina K afetada por, 532-534
Variação Gibbs na energia livre, 109
Variações genéticas, 632
Variações gênicas causando doença, 443-445
Variações no número de cópias, 443-445, 706
Variáveis pré-analíticas, 721-722
Vasodilatadores, 608
óxido nítrico como, 622
Vasos sanguíneos, afetando o óxido nítrico, 622
VEGF. *Ver* Fator de crescimento endotelial vascular
Velocidade
inicial, 74-75
inibidores que afetam, 79
máxima ($V_{máx}$)
concentração de substrato e, 75
efeitos alostéricos na, 88
equação de Michaelis-Menten na determinação da, 76
inibição afetando, 76
Velocidade inicial, 75
inibidores que afetam, 79
Velocidade máxima
efeitos alostéricos na, 88
inibidores afetando a, 79-80
Vesícula revestida
brefeldina-afetando, 564-565
Vesículas
abordagem genética para estudo, nas leveduras, 562, 564
de revestimento, 562, 564, 563*f*
brefeldina-afetando, 564-565
de transporte, 549, 561-566, 561-562*f*, 562, 564*t*
direcionadas, 561-562*f*
secretoras, 549, 550*f*
tipos e funções, 562, 564*t*
Vesículas COPI, 558-559, 561-562, 564*t*, 564-565
Vesículas COPII, 558-559, 562, 564*t*, 564-565
Vesículas de transporte, 549, 557, 561-565, 564*t*, 563*f*
definidas, 562, 564
no revestimento da vesícula, 562, 564
no trânsito intracelular, 561-562
Vesículas livres de clatrina, 561-562
Vesículas não revestidas de clatrina, 561-562
Vesículas revestidas por clatrina, 561-562, 564-565
Vesículas secretórias, 549, 550*f*
Vesículas sinápticas, 565-566
Vetor baseado em P1 (PAC) do bacteriófago de *E coli*, 437-439
Vetor do cromossomo artificial de levedura (YAC), 437-438
Vetor PAC (baseado em P1), 437-438
Vetores de clonagem, 436-440, 438-439*t*
Vi. *Ver* Velocidade inicial
Via clássica da ativação do complemento, 649
Via da ciclo-oxigenase , 224-226, 225-227*f*
Via da lipo-oxigenase, 224-226, 225-227*f*
Via das pentoses-fosfato, 152, 197-200, 198*f*, 199*f*, 201*f*
citosol como local para reações da, 197-198
deficiência da, 203-204
enzimas da, 190*t*
fase não oxidativa da, 200
fase oxidativa da, 198-200, 198*f*, 199*f*
hemólise dos eritrócitos e, 203-204
NADPH produzido pela, 197, 198*f*, 199*f*
para lipogênese, 218*f*, 219, 219-220*f*
ribose produzida pela, 198*f*, 200
Via de degradação lisossomal, defeitos nas lipidoses, 235
Via de informação, 501*f*
Via do ácido fosfatídico, 519
Via do ácido urônico, 201, 201-202*f*
interrupção da, 204
Via do cinurenina-antranilato, para o catabolismo do triptofano, 290, 291*f*
Via do glicerolfosfato, 231*f*
Via do Jak/STAT , 507, 508, 509*f*
Via do monoacilglicerol, 230, 231*f*, 519
Via do NF-κB
mecanismo de inibição, 509, 510
regulação, 508-510, 509*f*
Via do polifosfoinositídeo, ativação plaquetária e, 657
Via do poliol (sorbitol), 205-206
Via do receptor de morte, 708
Via do sorbitol (poliol), 205-206
Via exocitótica (secretória), 549
Via extrínseca da coagulação sanguínea, 651, 651*f*, 708
Via intrínseca da coagulação do sangue, 651-653, 651*f*
Via lisogênica, 416, 416*f*
Via lítica, 416, 416*f*

Via metabólica/fluxo de metabólito, 153-156. *Ver também* tipos específicos e Metabolismo
fluxo gerando reações na, 157
natureza unidirecional da, 85
reações desequilibradas na, 157
regulação da, 85-87, 85*f*, 157, 157*f*
modificação covalente na, 89
Via secretória (exocitótica), 549
Vias catabólicas/catabolismo, 110, 151. *Ver também* Reação exergônica; Metabolismo; substâncias específicas
energia capturada nas/no,-partir da cadeia respiratória, 126*f*, 127
Vias de transdução do sinalizador, 581
Vias de transdução do sinalizador e CBP/p300, 512*f*
Vírus
câncer causado por, 700, 701*t*
síntese de proteínas da célula hospedeira afetada por, 408*f*
Vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), 587
Vírus de DNA, 700
Vírus de RNA, 700
Vírus oncogênicos, 699, 699*f*
Vírus tumorais, 700
oncogenes, 702
Visão, vitamina-na, 527
Vitamina A, 527
deficiência de, 528-529
excesso/toxicidade de, 528-529
funções de, 527
na visão, 527
Vitamina B_1 (tiamina), 534
coenzimas derivadas-partir da, 59
deficiência de, 534
metabolismo do piruvato afetado por, 174, 176, 534
no ciclo do ácido cítrico, 166
Vitamina B_{12} (cobalamina), 537
absorção de, 537
fator intrínseco na, 521
deficiência de, 537-539
na metilmalonicacidúria, 189
Vitamina B_{12} dependente de enzimas, 537
Vitamina B_2 (riboflavina), 535
coenzimas derivadas-partir da, 59, 535
deficiência de, 535
desidrogenases dependentes de, 117
no ciclo do ácido cítrico, 166
Vitamina B_6 (piridoxina/piridoxal/piridoxamina), 536
deficiência de, 536
excreção de xanturenato, 292, 292*f*
excesso/toxicidade de, 536-537
Vitamina C (ácido ascórbico), 197, 540
absorção de ferro e, 521, 540
benefícios-partir da, 541
coenzimas, 540
como antioxidante, 148
deficiência de, 541
colágeno afetado na, 46
na síntese do colágeno, 45, 540
Vitamina D, 529
deficiência de, 531-532
ergosterol como precursor para, 147, 147*f*
excesso/toxicidade de, 531-532
metabolismo de, 529-532
na absorção do cálcio, 521, 530
Vitamina D_3 (colecalciferol), 531-532
como antioxidante, 119, 147
formação e hidroxilação da, 488*f*
vitamina E, 736
Vitamina E, 543, 546
Vitamina H. *Ver* Biotina
Vitamina K, 532-534
deficiência de, 533
na coagulação, 532
proteínas de ligação do cálcio e, 533-534
Vitamina K dependente de fatores da coagulação, 655
fármacos cumarínicos que afetam, 655
Vitamina K hidroquinona, 533, 534*f*
Vitaminas, 3, 525-541, 530*t*. *Ver também* tipos específicos
digestão e absorção das, 521
funções metabólicas das, 526
hidrossolúveis, 534-541
lipossolúveis, 526-534, 530*t*
no ciclo do ácido cítrico, 166
Vitaminas B. *Ver* Complexo de vitamina B
VLDL. *Ver* Lipoproteínas de densidade muito baixa
$V_{máx}$. *Ver* Velocidade máxima
VNTRs. *Ver* Números variáveis de unidades repetidas em *tandem*

X

Xantina, 326, 326*f*
Xantina-oxidase, 116
deficiência de, hipouricemia e, 339
Xanturenato, excreção do na deficiência de vitamina B_6, 292, 292*f*
Xenobióticos
classes principais dos, 676-677
definição, 676-677
metabolismo dos, 676-677
enzimas envolvidas no, 676-677
fases dos, 676-678
para excreção do corpo, 676-678
reações de conjugação, 678-681
respostas para
antigenicidade, 681-682
carcinogênicas, 681-682
farmacológicas, 680-681
tóxicas, 680-682, 681-682*f*
Xeroderma pigmentoso, estudo de caso de, 755-756
Xeroftalmia, deficiência de vitamina-na, 528-529, 530*t*
D-Xilose, 134-135*f*, 135*t*
D-Xilulose, 135*f*
L-Xilulose, 135*t*
acúmulo de, na pentosúria essencial, 204
XP. *Ver* Xeroderma pigmentoso

Z

Zimogênios, 89, 519
na coagulação do sangue, 651, 652*f*, 653*t*
resposta rápida para demanda fisiológica e, 89
Zinco, 541
Zíper de leucina, 428-429
Zona pelúcida, 582
ZP. *Ver* Zona pelúcida
Zwitterions, íons anfóteros, 20